

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORNIA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS**  
**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES OCEANOLOGICAS**

**DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGIA DE  
EXTRACCION, AISLAMIENTO, Y PURIFICACION DE  
MATERIAL HUMICO EN SEDIMENTOS MARINOS**



**TESIS**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO**  
**EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA**  
**PRESENTA:**  
**EDUARDO ORTIZ CAMPOS**

**Ensenada, Baja California**

**Noviembre de 1996**

Universidad Autónoma de Baja California  
Facultad de Ciencias Marinas  
Instituto de Investigaciones Oceanológicas

**DESARROLLO DE UNA NUEVA METODOLOGIA DE EXTRACCION,  
AISLAMIENTO, Y PURIFICACION DE MATERIAL HUMICO  
EN SEDIMENTOS MARINOS**

Tesis  
Que Para Obtener El Grado de Maestro  
En Ciencias En Oceanografía Costera  
Presenta:

**Eduardo Ortiz Campos**



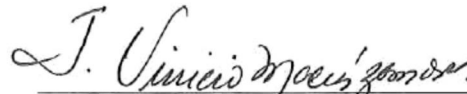
---

**Dr. José Domingo Carriquiry Beltrán  
PRESIDENTE DEL JURADO**



---

**Dr. Victor Froylán Camacho Ibar  
SINODAL PROPIETARIO**



---

**Dr. José Vinicio Macías Zamora  
SINODAL PROPIETARIO**

## RESUMEN

Aún con la existencia en la literatura de varias metodologías de extracción y purificación de material húmico (MH), se desarrolló un método alternativo (**M-IIO**) que minimiza la alteración composicional e incrementa la pureza de los extractos húmicos y fúlvicos. La evaluación de tres soluciones de extracción en el **M-IIO** indicó que la mejor opción es la solución 1:1 v/v de NaOH 0.1M y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (N/N). La ventaja de N/N es que extrae fracciones húmicas y fúlvicas que no se obtienen a partir de las soluciones de NaOH 0.1M y 0.5M. Aún cuando el MH de N/N no presentó los mayores grados de pureza, estos pueden mejorarse con un intercambio catiónico exhaustivo. Al comparar las técnicas del **M-IIO** con las que utilizan otras metodologías (incluyendo al método de Schnitzer que también fue implementado en la presente investigación), se determinó que para el ácido húmico el **M-IIO-N/N** siguió constituyéndose como la mejor opción. Sin embargo para el ácido fúlvico, el método de Holtzclaw puede ser tan recomendable como el **M-IIO-N/N** si es que se desarrolla utilizando la solución de N/N.

*Dedicatoria*

A la memoria de mi madre:  
Sofía Ortiz Campos

A mi madrina:  
Martha Campos Eubanks

A mi esposa:  
Lucía

## *Agradecimientos*

Al Dr. José D. Carriquiry Beltrán, presidente del jurado, por su constante estímulo, asistencia académica en el campode la Geoquímica Marina, y sobre todo por su desinteresada amistad.

Al Dr. Víctor F. Camacho Ibar y al Dr. José Vinicio Macías Zamora, por sus valiosos consejos para mejorar la calidad del presente trabajo.

A mi esposa, Biol. Lucía Villegas Ramirez, por su invaluable cariño y su permanente motivación para superarme en todos los campos de la vida.

## CONTENIDO

	<i>Página</i>
I. INTRODUCCION.....	1
II. OBJETIVOS.....	3
III. METODOLOGIAS.....	4
• <i>Diagrama de Flujo del M-IIO</i> .....	5
• <i>Diagrama de Flujo del M-SCH</i> .....	6
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	7
<u><i>RESULTADOS ANALITICOS</i></u> .....	7
• <b>Acido Húmico (AH)</b> .....	7
<i>Metodología IIO</i> .....	7
— <i>AH-Na Extraido</i> .....	7
— <i>Purificación por filtración</i> .....	9
<i>Metodología IIO vs Metodología Schnitzer</i> .....	11
— <i>Recuperación de AH-H</i> .....	11
— <i>Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos</i> .....	14
— <i>Espectros IR de AH-H</i> .....	16
• <b>Acido Fúlvico (AF)</b> .....	20
<i>Metodología IIO</i> .....	20
— <i>AF-Na Extraido</i> .....	21
— <i>Purificación por filtración</i> .....	23
<i>Metodología IIO vs Metodología Schnitzer</i> .....	27
— <i>Recuperación de AF-H</i> .....	27
— <i>Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos</i> .....	29
— <i>Espectros IR de AF-H</i> .....	31

<b><u>RESULTADOS COMPARATIVOS</u></b> .....	35
• <b>Acido Húmico (AH)</b> .....	35
— <i>Metodología IIO vs Otras Metodologías de la Bibliografía</i> .....	35
• <b>Acido Fúlvico (AF)</b> .....	39
— <i>Metodología IIO vs Otras Metodologías de la Bibliografía</i> .....	39
<b>V. CONCLUSION</b> .....	43
<b>VI. LITERATURA CITADA</b> .....	45
<b>APENDICES</b>	

## LISTA DE FIGURAS

<i>Figura</i>	<i>Página</i>
1 : <i>Diagrama de Flujo del M-IIO</i> .....	5
2 : <i>Diagrama de Flujo del M-SCH</i> .....	6
3 : <i>AH-Na Extraído por M-IIO</i> .....	8
4 : <i>Purificación de AH-Na en 0.45 <math>\mu\text{m}</math> por M-IIO</i> .....	10
5 : <i>Purificación de AH-Na en 0.20 <math>\mu\text{m}</math> por M-IIO</i> .....	10
6 : <i>AH-H Recuperado por M-IIO y M-SCH</i> .....	13
7 : <i>Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y M-SCH</i> .....	15
8 : <i>Espectros IR de AH-H Extraídos por M-IIO y M-SCH</i> .....	17
9 : <i>AF-Na Extraído por M-IIO</i> .....	22
10 : <i>Purificación de AF-Na en 0.45 <math>\mu\text{m}</math> por M-IIO</i> .....	25
11 : <i>Purificación de AF-Na en 0.20 <math>\mu\text{m}</math>-básico por M-IIO</i> .....	25
12 : <i>Purificación de AF-Na en 0.20 <math>\mu\text{m}</math>-ácido por M-IIO</i> .....	25
13 : <i>AF-H Recuperado por M-IIO y M-SCH</i> .....	28
14 : <i>Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos por M-IIO y M-SCH</i> .....	30
15 : <i>Espectros IR de AF-H Extraídos por M-IIO y M-SCH</i> .....	32
16 : <i>Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía</i> .....	38
17 : <i>Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía</i> .....	42

## LISTA DE TABLAS

- I. Resultados de AH-Na Extraído por M-IIO:** (a) Promedio de AH-Na Extraído (mg.) por cada solución utilizada. (b) Pruebas Estadísticas entre las soluciones de extracción.....8
- II. Resultados de Purificación por Filtración de AH-Na en M-IIO:** (a) Promedio de CI Retenidos (mg.) en filtros de nitrato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$  (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones a 0.45  $\mu\text{m}$ , (c) Entre soluciones a 0.20  $\mu\text{m}$ , (d) Para comparar las retenciones a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ .....9 – 10
- III. Resultados de AH-H Recuperado:** (a) Promedio de AH-H Recuperado (mg.) por cada solución utilizada. Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar las recuperaciones en ambos métodos.....12
- IV. Resultados de la Fracción Inorgánica en los Extractos Húmicos:** (a) Contenido promedio de ceniza (en %) en los AH-H (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar los contenidos de ceniza en ambos métodos.....14 – 15
- V. Resultados de AF-Na Extraído por M-IIO:** (a) Promedio de AF-Na Extraído (mg.) por cada solución utilizada. (b) Pruebas Estadísticas entre las soluciones de extracción.....21
- VI. Resultados de Purificación por Filtración de AF-Na en M-IIO [a  $\rightarrow$  f] y Comparaciones en retenciones en AH-Na y AF-Na [g, h]:** (a) Promedio de CI Retenidos (mg.) a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$  (básico y ácido). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones a 0.45  $\mu\text{m}$ , (c) Entre soluciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -básico, (d) Entre soluciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido, (e) Entre retenciones a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ -básico, (f) Entre retenciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -básico y 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido, (g) Entre retenciones en AH-Na y AF-Na en 0.45  $\mu\text{m}$ , (h) Entre retenciones en AH-Na y AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -básico.....23 – 24
- VII. Resultados de AF-H Recuperado:** (a) Promedio de AF-H Recuperado (mg.) por cada solución utilizada. Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar las recuperaciones en ambos métodos.....27 – 28
- VIII. Resultados de la Fracción Inorgánica en los Extractos Fúlvicos:** (a) Contenido promedio de ceniza (en %) en los AF-H (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar los contenidos de ceniza en ambos métodos .....29 – 30
- IX. Resultados Comparativos en la Pureza de AH-H Obtenidos por M-IIO y Otras Metodologías de la Bibliografía:** (a) Promedio del contenido de ceniza en AH-H de diferentes métodos. (b) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (c) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (d) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (e) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (f) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M. (g) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M.....35 – 37

<b>X. Resultados Comparativos en la Pureza de AF-H Obtenidos por M-IIO y Otras Metodologías de la Bibliografía:</b>	
<b>(a)</b> Promedio del contenido de ceniza en AF-H de diferentes métodos.	
<b>(b)</b> Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M.	
<b>(c)</b> Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M.	
<b>(d)</b> Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N.	
<b>(e)</b> Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N.	
<b>(f)</b> Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M.	
<b>(g)</b> Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M.	40 – 41

## SIMBOLOGIA

Acido Clorhídrico.....	HCl
Acido Clorhídrico/Acido Fluorhídrico.....	HCl/HF
Acido Fúlvico.....	AF
Acido Fúlvico Protonado.....	AF-H
Acido Húmico.....	AH
Acido Húmico Protonado.....	AH-H
Acido Sulfúrico.....	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Compuestos Inorgánicos.....	CI
Diferencias Estadísticamente Significativas.....	D.E.S.
Dimetilsulfóxido.....	DMSO
Fulvato-Sódico.....	AF-Na
Hidróxido de Amonio.....	NH <sub>4</sub> OH
Hidróxido de Sodio.....	NaOH
Humato-Sódico.....	AH-Na
Ion Amonio.....	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>
Ion Pirofosfato.....	P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>-4</sup>
Ion Sulfito.....	SO <sub>3</sub> <sup>-2</sup>
Material Húmico.....	MH
Materia Orgánica.....	MO
Método-Holtzclaw.....	M-H
Método-Hori y Okuda.....	M-HyO
Método-Instituto de Investigaciones Oceanológicas.....	M-IIO
Método-King.....	M-K
Método-Malcolm.....	M-M
Método-Martin, F.....	M-M.F
Método-Nissenbaum y Kaplan.....	M-NyK
Método-Ortiz de Serra.....	M-OdeS
Método-Piccolo.....	M-P
Método-Pierce y Felbeck.....	M-PyF
Método-Poutanen y Morris.....	M-PyM
Método-Schnitzer.....	M-SCH
Método-Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas.....	M-IHSS
NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M.....	N/N
N,N-Dimetilformamido.....	DMF
Pirofosfato de Sodio.....	Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub>

## I. INTRODUCCION

Las sustancias fúlvicas y húmicas, designadas generalmente como material húmico (MH), constituyen un grupo de compuestos orgánicos formados por la descomposición de organismos de suelos, agua, y sedimentos. Debido a su compleja composición, Buffle (1990) los define como los compuestos orgánicos de suelos, agua, o sedimentos, que no son proteínas, lípidos, polisacáridos, ni las unidades estructurales de estos. Ya que los organismos vivos se constituyen por un gran número de compuestos orgánicos diferentes, la degradación y posible recombinación de los productos resultantes, produce una gran cantidad de moléculas fúlvicas y húmicas diferentes. Esta amplia variabilidad hace que el MH muestre propiedades diversas (*e.g.*, grados de solubilidad, condensación y humificación, peso molecular, actividad superficial), y que influya en un gran número de procesos ambientales. Así, el MH influye en el comportamiento geoquímico de una gran cantidad de compuestos orgánicos (*e.g.*, pesticidas y PCB's) e inorgánicos (*e.g.*, metales), al llevar a cabo diferentes mecanismos de reacción con ellos (Livens, 1991). Asimismo, los compuestos fúlvicos (principalmente) y húmicos juegan un papel trascendente en la productividad primaria oceánica y terrestre, al estimular el crecimiento fitoplanctónico y de plantas superiores respectivamente. Tal estimulación biológica se logra con su influencia en varias funciones fisiológicas y/o con la mayor disponibilidad de nutrientes para los productores primarios (Rashid, 1985). Además, las sustancias fúlvicas y húmicas (principalmente) constituyen una poderosa fuente de información para determinar condiciones contemporáneas y paleoambientales; por lo que se utilizan como indicadores ambientales de contaminación orgánica e inorgánica o como marcadores geológicos para conocer las fuentes de materia orgánica (MO), paleotemperaturas, geocronologías, procesos sedimentarios, cambios climáticos, etc. (Rashid, 1985).

En el medio marino el MH representa la fracción de MO más resistente a degradación microbiana, y una vez en el sedimento, llega a constituirse como su principal componente orgánico (Nissenbaum y Kaplan, 1972). Para Yariv y Cross (1979) esta fracción representa entre el 60-80%, para Yunqian *et al.*, (1986) es entre el 30-60%, mientras que para Buffle (1990) comprende un 70%. Sin embargo, esta discrepancia en el

contenido de MH en sedimentos se debe a diferencias en las propiedades físicas y químicas que operan en los distintos cuerpos sedimentarios, siendo particularmente importante el contenido de oxígeno presente. El carácter refractario del MH es para Eglinton y Barnes (1978) el resultado de un gran "entrecruzamiento" de diferentes enlaces, que provocan una alta estabilidad química. Barnes *et al.*, (1984) indican que la "irregularidad" en los enlaces, las voluminosas estructuras tridimensionales, y la presencia de grupos fenólicos, hacen que el MH sea poco accesible a ser atacado por enzimas microbianas. Buffle (1990) menciona que el MH debe estudiarse no solo porque constituya el componente orgánico principal de suelos, agua, y sedimentos, sino porque es muy representativo de sistemas ambientales complejos, tal como un suelo o sedimento.

Dada su compleja naturaleza química, la extracción y purificación de MO de suelos y sedimentos constituye uno de los principales problemas en su investigación. Consecuentemente, no existe un método estandarizado para lograr dichos fines. Esta problemática se debe a la dificultad en evitar alteración química de la MO durante su extracción y purificación, así como la obtención de productos con bajo contenido en compuestos inorgánicos (CI) (King, 1967; Malcolm, 1976; Rice y MacCarthy, 1989). Debido a esto se hace necesario crear condiciones de extracción más "suaves" y mejorar los procedimientos de purificación del MH, con el objeto de causar una mínima alteración composicional, y obtenerlo a la vez con una alta pureza (bajo contenido de ceniza).

De acuerdo a Piccolo (1988), la ausencia de condiciones de extracción "suaves" y la aplicación de ciertos procedimientos de purificación (*i.e.*, HCl/HF) en el MH, provocan alteración en su composición; lo cual se traduce en modificaciones en algunas de sus características y/o propiedades (*e.g.*, absorbancia de luz, razones elementales e isotópicas, grados de solubilidad y condensación, estabilidad química, reactividad superficial, tamaños y pesos moleculares). De igual manera, Malcolm (1976) menciona que la obtención de MH ultrapuro (> 99%) es necesario para caracterizar adecuadamente la reactividad orgánica en sistemas naturales. La asociación de la fase orgánica con impurezas inorgánicas [*e.g.*, minerales de arcilla (cristalinos y amorfos) o varios iones metálicos], provocan falsos resultados en reactividad orgánica que a su vez se traducen en interpretaciones erróneas. El problema de la asociación organica-inorgánica se debe a que

los minerales arcillosos exhiben propiedades similares a los compuestos orgánicos respecto a reactividad superficial, capacidad de intercambio iónico, complejación, capacidad de retención de agua, capacidad calorífica, etc.. Consecuentemente, la presencia de CI es la principal limitante en el uso de MH para interpretar procesos geoquímicos (Malcolm, 1976). Por otra parte, la falta de protonación del MH (sal ácida) en algunos estudios de caracterización del mismo, da como consecuencia inconsistencias en los resultados obtenidos, lo que origina una pobre comparación de estos. Tales inconsistencias resultan de una saturación iónica heterogénea en los grupos funcionales de las moléculas fúlvicas y húmicas. Asimismo, comparar los resultados obtenidos a partir de sales organometálicas con las formas ácidas no es adecuado, ya que las propiedades de las primeras son diferentes y además varían con el tipo de sal metálica asociada (Malcolm, 1976).

## II. OBJETIVOS

Desarrollar una metodología alternativa de extracción, aislamiento, y purificación de material húmico presente en sedimentos marinos, que tenga las siguientes características:

- a) Que genere una mayor recuperación de material húmico respecto a la metodología de Schnitzer (**M-SCH**), que es la más utilizada, y que se realiza en la presente investigación.
- b) Que genere fracciones orgánicas de mayor pureza (bajo contenido de ceniza) que las obtenidas por la **M-SCH** y por otros métodos existentes que reportan la cantidad de ceniza de algunos de sus extractos fúlvicos y/o húmicos (datos bibliográficos).
- c) Que genere extractos orgánicos con una menor alteración composicional que los obtenidos por el **M-SCH**.

### III. METODOLOGIAS

En esta sección se incluyen los diagramas de flujo de los métodos realizados en el laboratorio. Por una parte se desarrolló una metodología nueva: **M-IIO** (Fig. 1), y por otro lado se aplicó la metodología más utilizada: **M-SCH** (Fig. 2). Tanto el marco teórico que fundamenta las técnicas aplicadas en el **M-IIO**, así como aquellas que resultan ser inconvenientes y que son utilizadas por uno o varios métodos, son explicadas detalladamente en el Apéndice.

Inicialmente se buscó un sedimento que mostrase un alto contenido de MO para así tener la posibilidad de obtener cantidades relativamente grandes de MH-sedimentario. Se colectaron aproximadamente 10 kgs. de sedimento (muestra) en el Estero de Punta Banda, el cual se congeló inmediatamente a  $-25^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, la muestra sedimentaria fue secada a  $-55^{\circ}\text{C}$  por la técnica de liofilización. Una vez seca, la muestra fue homogenizada para tratar de asegurar una distribución homogénea de todos los tamaños de grano, y tener por tanto la misma probabilidad de encontrar iguales cantidades de MO en cualquier parte de la misma. Una vez realizado lo anterior, se dividió la muestra en pseudoréplicas de 100 grs, para así reducir la posibilidad de extraer cantidades mínimas de MH en cada una de ellas. En seguida, se dividieron las pseudoréplicas en cinco grupos (submuestras); resultando finalmente: tres submuestras con 20 pseudoréplicas cada una, una submuestra con 14, y otra con 13. Las submuestras de 20 pseudoréplicas fueron utilizadas para la aplicación del **M-IIO**, y las dos restantes para aplicarles el **M-SCH**.

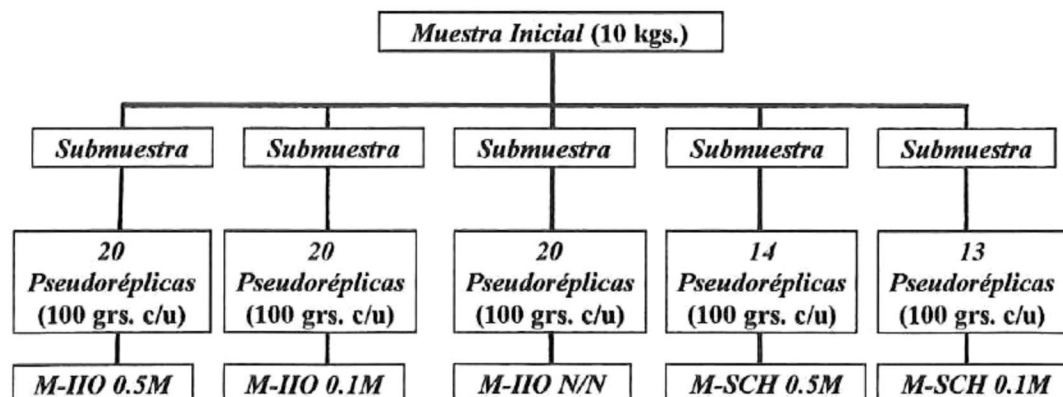


Fig. 1: Diagrama de Flujo del M-IIO

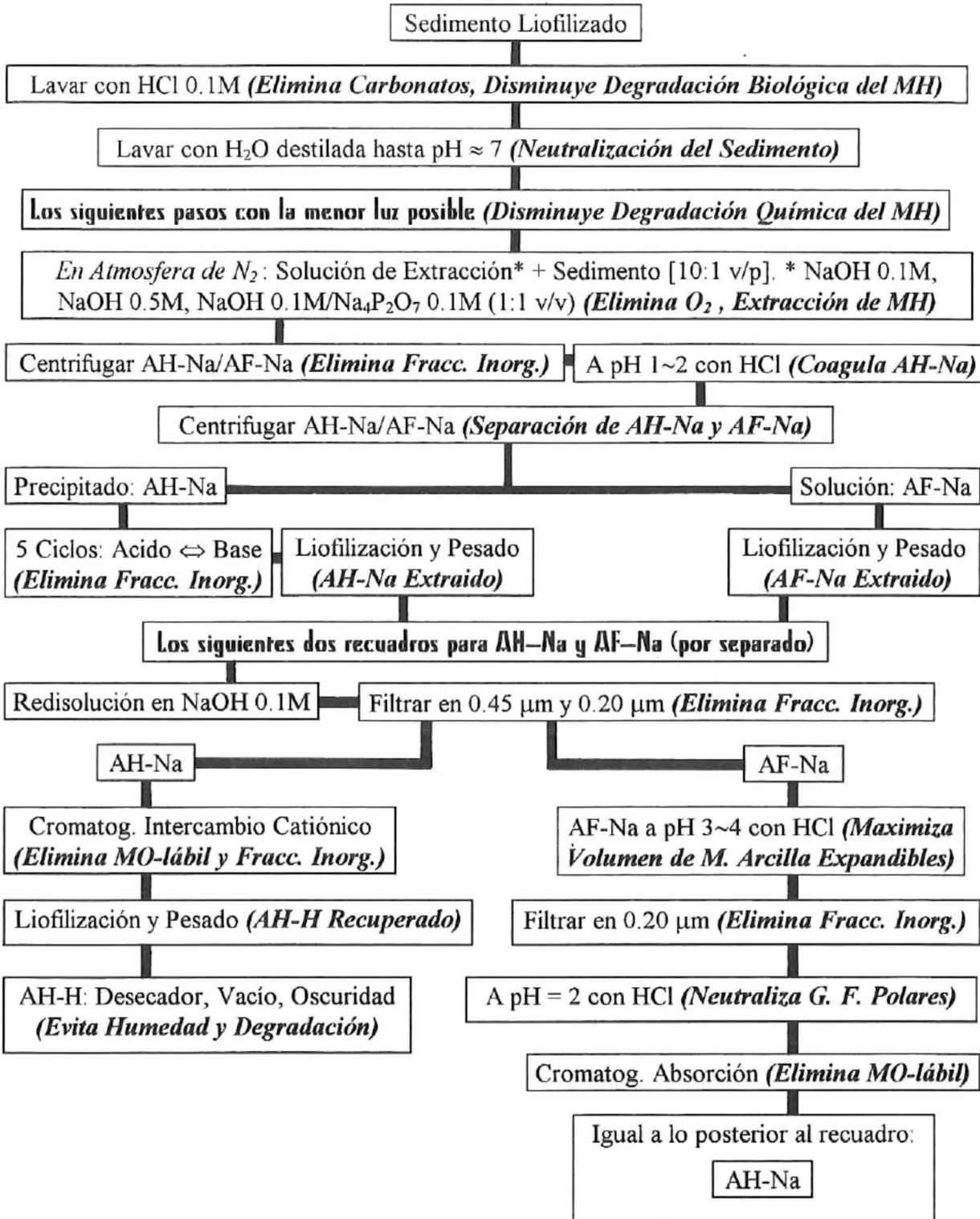
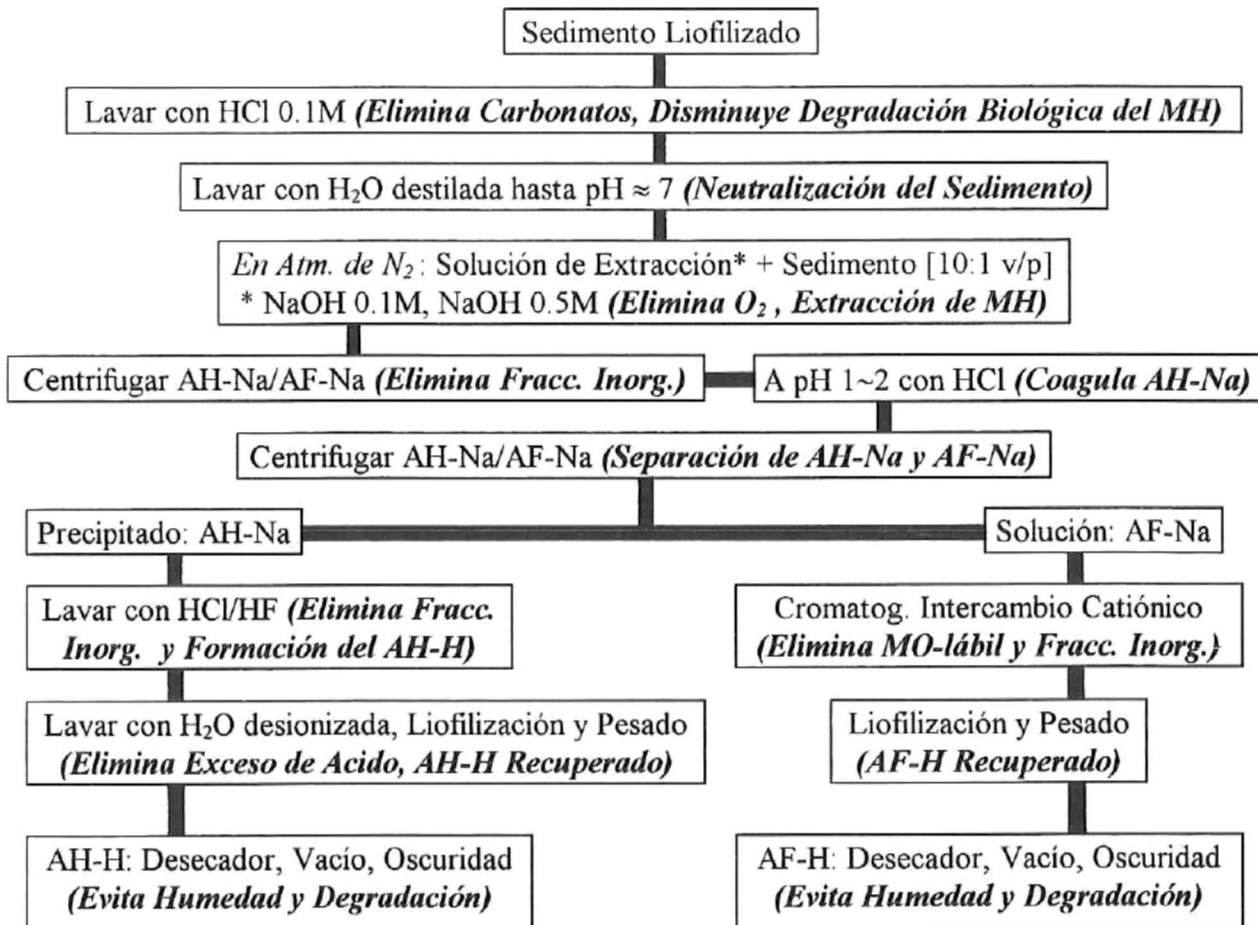


Fig. 2: Diagrama de Flujo del M-SCH



#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Esta sección muestra dos divisiones. La primera corresponde a resultados obtenidos en el laboratorio y se denomina: *Resultados Analíticos*. La segunda consiste en resultados comparativos entre el **M-IIO** y metodologías disponibles de la bibliografía: *Resultados Comparativos*.

##### **RESULTADOS ANALITICOS:**

##### **Acido Húmico (AH):**

##### ***Metodología IIO:***

Se presenta la capacidad de extracción de cada solución utilizada por el **M-IIO**, así como las cantidades de CI que se eliminan por medio de los filtrados.

##### **AH-Na Extraído:**

Para extraer MH-sedimentario por el **M-IIO**, se recurrió a tres soluciones diferentes: NaOH 0.5M, NaOH 0.1M, y NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (N/N). Cada solución fue utilizada con la misma proporción solución-sedimento (10:1 v/p) en tres submuestras sedimentarias distintas, constituidas cada una por 20 pseudoréplicas de 100 grs. Los datos totales obtenidos para los AH-Na extraídos se encuentran en la Tabla: AH-1 (Apéndice AH). Las Tablas I (a y b) muestran el promedio de extracción, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas I. Resultados de AH-Na Extraído por M-IIO:** (a) Promedio de AH-Na Extraído (mg.) por cada solución utilizada. (b) Pruebas Estadísticas entre las soluciones de extracción.

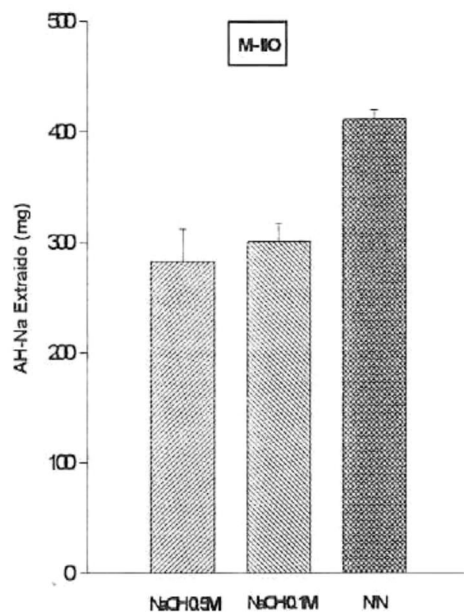
Tabla Ia

Sln. de Extracción	Promedio de AH-Na Extraído (mg.)
NaOH 0.5M	282.9 ± 29.1
NaOH 0.1M	301.1 ± 15.9
N/N	412.0 ± 8.1

Tabla Ib

Prueba de Kruskal-Wallis de 1 Vía: $P < 0.0001 \Rightarrow$ D.E.S.		
Prueba de Contrastes de Tukey: $P < 0.05$		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 3: AH-Na Extraído por M-IIO.** Promedio en cantidades extraídas de AH-Na. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v).

En base a lo obtenido en las Tablas Ia y Ib, y a lo observado en la Fig. 3; la solución de N/N presenta una mayor capacidad de extracción que las soluciones de NaOH. De acuerdo a Kononova (1982), tal hecho puede deberse a que el ion pirofosfato ( $P_2O_7^{-4}$ ) forma sales con cationes trivalentes (e.g.,  $Fe^{+3}$  y  $Al^{+3}$ ) que estaban unidos a una fracción de AH; consecuentemente esta fracción se libera a la solución. Asimismo, las soluciones de NaOH no extraen dicha fracción húmica, por lo cual son selectivas.

### Purificación por filtración:

En cada solución de extracción utilizada en el M-IIO, se determinó el peso de la fracción inorgánica retenida en filtros de nitrato de celulosa de  $0.45\mu m$  y  $0.20\mu m$ . Esto fue para saber si en filtros de la misma nominación, existían diferencias en CI incorporados por las tres soluciones. Asimismo, en cada solución se compararon los pesos retenidos en ambos filtrados. Los datos totales de las retenciones se encuentran en las Tablas: AH-2 (para  $0.45\mu m$ ) y AH-3 (para  $0.20\mu m$ ), ambas en el Apéndice AH. Las Tablas II (a  $\rightarrow$  d) muestran el promedio de CI retenidos, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas II. Resultados de Purificación por Filtración de AH-Na en M-IIO: (a) Promedio de CI Retenidos (mg.) en filtros de nitrato de celulosa de  $0.45\mu m$  y  $0.20\mu m$  (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones a  $0.45\mu m$ , (c) Entre soluciones a  $0.20\mu m$ , (d) Para comparar las retenciones a  $0.45\mu m$  y  $0.20\mu m$ .**

Tabla II.a

Solución de AH-Na:	Promedio de CI Retenidos (mg.)	
	$0.45\mu m$	$0.20\mu m$
NaOH 0.5M	$2.6 \pm 0.5$	$3.7 \pm 0.5$
NaOH 0.1M	$2.8 \pm 0.3$	$3.9 \pm 0.4$
N/N	$3.5 \pm 0.2$	$4.7 \pm 0.3$

Tabla II.b

Filtración en 0.45 $\mu\text{m}$ :		
<i>Kruskal-Wallis de 1 Vía: <math>P &lt; 0.0001 \Rightarrow</math> D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: <math>P &lt; 0.05</math></i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

Tabla II.c

Filtración en 0.20 $\mu\text{m}$ :		
<i>ANOVA de 1 Vía: <math>P &lt; 0.01 \Rightarrow</math> D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: <math>P &lt; 0.05</math></i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

Tabla II.d

Filtraciones: 0.45 $\mu\text{m}$ vs 0.20 $\mu\text{m}$		
Sln. de Extracción:	<i>t-Student: <math>P &lt; 0.0001</math></i>	<i>Mann-Whitney: <math>P &lt; 0.0001</math></i>
NaOH 0.5M	D.E.S.	—
NaOH 0.1M	—	D.E.S.
N/N	D.E.S.	—

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas

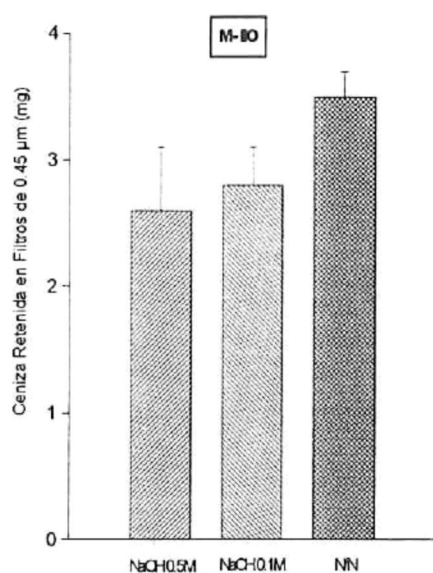


Fig. 4: Purificación de AH-Na en 0.45  $\mu\text{m}$  por M-IO. Promedio en compuestos inorgánicos retenidos. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M /  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1M (1:1 v/v).

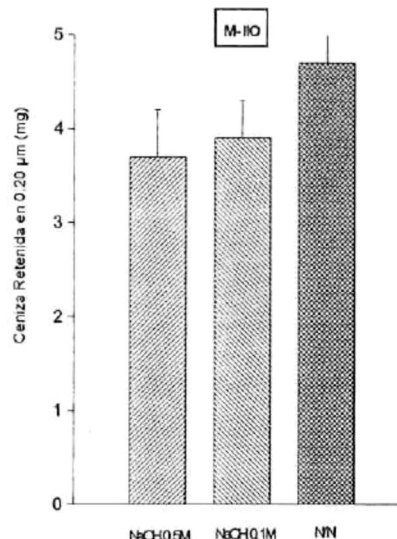


Fig. 5: Purificación de AH-Na en 0.20  $\mu\text{m}$  por M-IO. Promedio en compuestos inorgánicos retenidos. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M /  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1M (1:1 v/v).

De acuerdo a las Tablas IIa → II d, y a lo que se observa en las Figs. 4 y 5; la solución de N/N incorporó más CI  $> 0.45 \mu\text{m}$  y  $> 0.20 \mu\text{m}$  que las otras dos soluciones. Tales constituyentes en “exceso”, pueden provenir de la fracción húmica que estaba asociada a los cationes trivalentes cuando esta se encontraba en el sedimento, y que no fue extraída por las soluciones de NaOH. Por otra parte, parece ser que para las tres soluciones de extracción, dominaron los CI comprendidos entre  $0.20\text{--}0.45 \mu\text{m}$  sobre los  $> 0.45 \mu\text{m}$ . Sin embargo, esto no significa que una posible fracción inorgánica  $< 0.20 \mu\text{m}$  no haya sido la más dominante.

#### ***Metodología IIO vs Metodología Schnitzer:***

Se realizan comparaciones entre los AH-H obtenidos por el **M-IIO** y el **M-SCH** (ambos con todas sus soluciones de extracción) en cuanto a las cantidades recuperadas, grados de pureza, y en los espectros IR de aquellos extractos que mostraron el menor contenido de ceniza en cada submuestra.

#### **Recuperación de AH-H:**

Una vez obtenidos y pesados los AH-H de las submuestras del **M-IIO** y del **M-SCH**, se determinaron los promedios de recuperación en cada una de ellas y fueron comparados. El total de datos de las recuperaciones de AH-H se encuentran en la Tabla: AH-4 (Apéndice AH). Las Tablas III (a → d) muestran el promedio de recuperación, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas III. Resultados de AH-H Recuperado:** (a) Promedio de AH-H Recuperado (mg.) por cada solución utilizada. Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH (d) Para comparar las recuperaciones en ambos métodos.

Tabla III.a

Solución de Extracción	Promedio de AH-H Recuperado (mg)	
	M-IIO	M-SCH
NaOH 0.5M	275.5 ± 29.3	249.3 ± 5.7
NaOH 0.1M	293.4 ± 16.0	264.9 ± 8.6
N/N	402.3 ± 8.2	—

Tabla III.b

M-IIO :		
<i>Kruskall-Wallis de 1 Via: P &lt; 0.0001 ⇒ D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: P &lt; 0.05</i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

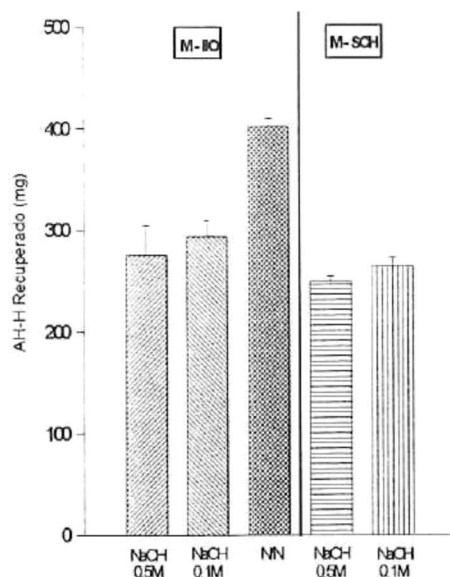
Tabla III.c

M-SCH :	
<i>Prueba t-Student: P &lt; 0.0001</i>	
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M
NaOH 0.5M	D.E.S.

Tabla III.d

M-IIO vs M-SCH		
Sln. de Extracción:	<i>Mann-Whitney: P &lt; 0.0051</i>	<i>t-Student: P &lt; 0.0001</i>
NaOH 0.5M	D.E.S.	—
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 6: AH-H Recuperado por M-IIO y M-SCH.** Promedio en cantidades recuperadas de AH-H. [M-IIO] : 20 pseudoréplicas por solución. [M-SCH] : 14 pseudoréplicas en NaOH 0.5M, y 13 pseudoréplicas en NaOH 0.1M. N/N = NaOH 0.1M /  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1M (1:1 v/v).

Considerando lo encontrado en las Tablas IIIa → IIIId, y lo que muestra la Fig. 6; al aplicar el **M-IIO** se recupera una mayor cantidad de AH-H si este se extrae con la solución de N/N. Para las submuestras del **M-SCH**, la recuperación fue mayor para el AH-H extraído con NaOH 0.1M. Esto indica que el NaOH 0.5M extrajo menos AH, lo que Schnitzer (1982) atribuye a una condición menos hidrofílica de las moléculas húmicas en este medio de mayor fuerza iónica. El mayor contenido de Na disminuye la cantidad de sitios aniónicos libres necesarios para hidratar a las moléculas, lo que finalmente se traduce en una extracción limitada. Por otro lado, una comparación entre el **M-IIO** vs **M-SCH** consistió en evaluar las cantidades recuperadas de AH-H a partir de la misma solución. Esto se realizó con NaOH 0.5M y 0.1M. Como teóricamente, la aplicación de la misma solución en ambos métodos debió extraer iguales cantidades de AH-Na (por ser la misma muestra), la comparación de las recuperaciones de AH-H se consideró como un parámetro para discriminar cual de las dos metodologías causó una menor pérdida de la fracción húmica durante su desarrollo. Los resultados para ambas soluciones de NaOH indicaron que durante el desarrollo del **M-IIO** se dió una menor pérdida de AH (-Na y/o

H) respecto al **M-SCH**, aún cuando el primero involucró una mayor manipulación. Probablemente las pérdidas importantes de AH en el **M-SCH** se efectuaron durante los lavados con la solución de HCl/HF.

### Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos:

En todas las pseudoréplicas de las cinco submuestras se determinó el contenido inorgánico. Posteriormente se calcularon los promedios de las cantidades de ceniza para todas las submuestras y fueron comparados entre sí. Los datos totales en los contenidos de ceniza de los AH-H se encuentran en la Tabla: AH-5 (Apéndice AH). Las Tablas IV (a → d) muestran el promedio de ceniza, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas IV. Resultados de la Fracción Inorgánica en los Extractos Húmicos:** (a) *Contenido promedio de ceniza (en %) en los AH-H (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas:* (b) *Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar los contenidos de ceniza en ambos métodos.*

Tabla IV.a

Solución de Extracción	Contenido promedio de ceniza (en %) del AH-H	
	M-IIO	M-SCH
NaOH 0.5M	0.5 ± 0.1	2.0 ± 0.1
NaOH 0.1M	1.3 ± 0.2	3.2 ± 0.1
N/N	1.4 ± 0.1	—

Tabla IV.b

M-IIO :		
<i>Kruskall-Wallis de 1 Vía: P &lt; 0.0001 ⇒ D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: P &lt; 0.05</i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	D.E.S.	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	IGUALES

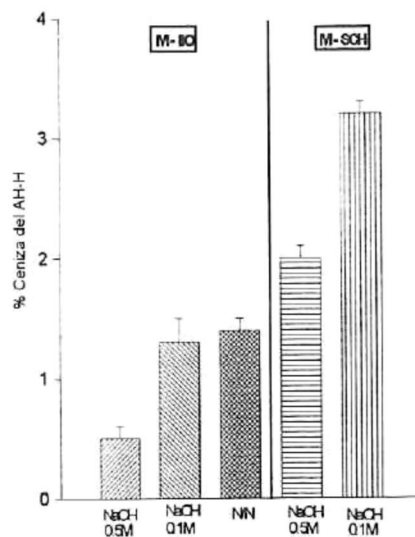
Tabla IV.c

M-SCH :	
<i>Prueba de Mann-Whitney: P &lt; 0.0001</i>	
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M
NaOH 0.5M	D.E.S.

Tabla IV.d

M-IIO vs M-SCH	
Sln. de Extracción:	<i>Mann-Whitney: P &lt; 0.0001</i>
NaOH 0.5M	D.E.S.
NaOH 0.1M	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 7: Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y M-SCH.** Promedio en grados de pureza de AH-H, obtenido por cada solución de extracción utilizada. [M-IIO] : 20 pseudoréplicas por solución. [M-SCH] : 14 pseudoréplicas en NaOH 0.5M, y 13 pseudoréplicas en NaOH 0.1M. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v).

Si para las submuestras del **M-IIO** relacionamos lo obtenido en las Tablas IVa → IVd y Fig. 7, con los resultados de las retenciones en los filtros, se encuentra el mismo grado de pureza entre los AH-H extraídos con NaOH 0.1M y N/N; a pesar de que esta última haya incorporado una fracción inorgánica mayor durante la extracción. Sin embargo, los extractos húmicos más puros se obtuvieron a partir de NaOH 0.5M; aún cuando los CI incorporados por esta misma hayan sido aparentemente similares a los de la solución de NaOH 0.1M. Entre las submuestras del **M-SCH** se obtuvo asimismo una mayor pureza en el AH-H extraído con NaOH 0.5M. Aunando este resultado con las recuperaciones de

AH-H por este método, se observó que una mayor fuerza iónica en la solución extractora implicó una mayor pureza, pero a la vez provocó una menor recuperación de la fracción húmica. Por otra parte, al comparar la pureza de los extractos húmicos obtenidos por las dos metodologías, se encontró que utilizando la misma solución (NaOH 0.1M ó 0.5M) el **M-IIO** produce AH-H con menores cantidades de ceniza que los que se obtienen a partir del **M-SCH**. Esto es indicativo de que el **M-IIO** es un método más efectivo para remover las impurezas inorgánicas que se incorporan durante la extracción del AH-sedimentario.

### Espectros IR de AH-H:

En cada submuestra del **M-IIO** y el **M-SCH** se escogió la pseudoréplica que tuviese el mayor grado de pureza y se preparó para correr el IR. Dicha preparación consistió en lo siguiente:

Pseudoréplica

Mezclar y Moler en Mortero de Agata: 0.5 mg de AH-H (lío-filizado) + 25 mg de Kbr seco (grado IR)

Hacer una pastilla de superficie uniforme

Colocar la pastilla en la celda del espectrofotómetro de IR ⇒ Obtener el Espectro

Una vez obtenidos los espectros, estos fueron comparados entre sí para determinar posibles diferencias composicionales entre los extractos húmicos obtenidos. Los AH-H utilizados para el análisis de IR fueron:

**M-IIO** : Submuestra con NaOH 0.5M ⇒ Pseudoréplica # 2 (% Ceniza = 0.3)

**M-IIO** : Submuestra con NaOH 0.1M ⇒ Pseudoréplica # 4 (% Ceniza = 0.9)

**M-IIO** : Submuestra con N/N ⇒ Pseudoréplica # 1 (% Ceniza = 1.2)

**M-SCH** : Submuestra con NaOH 0.5M ⇒ Pseudoréplica # 4 (% Ceniza = 1.8)

**M-SCH** : Submuestra con NaOH 0.1M ⇒ Pseudoréplica # 2 (% Ceniza = 3.1)

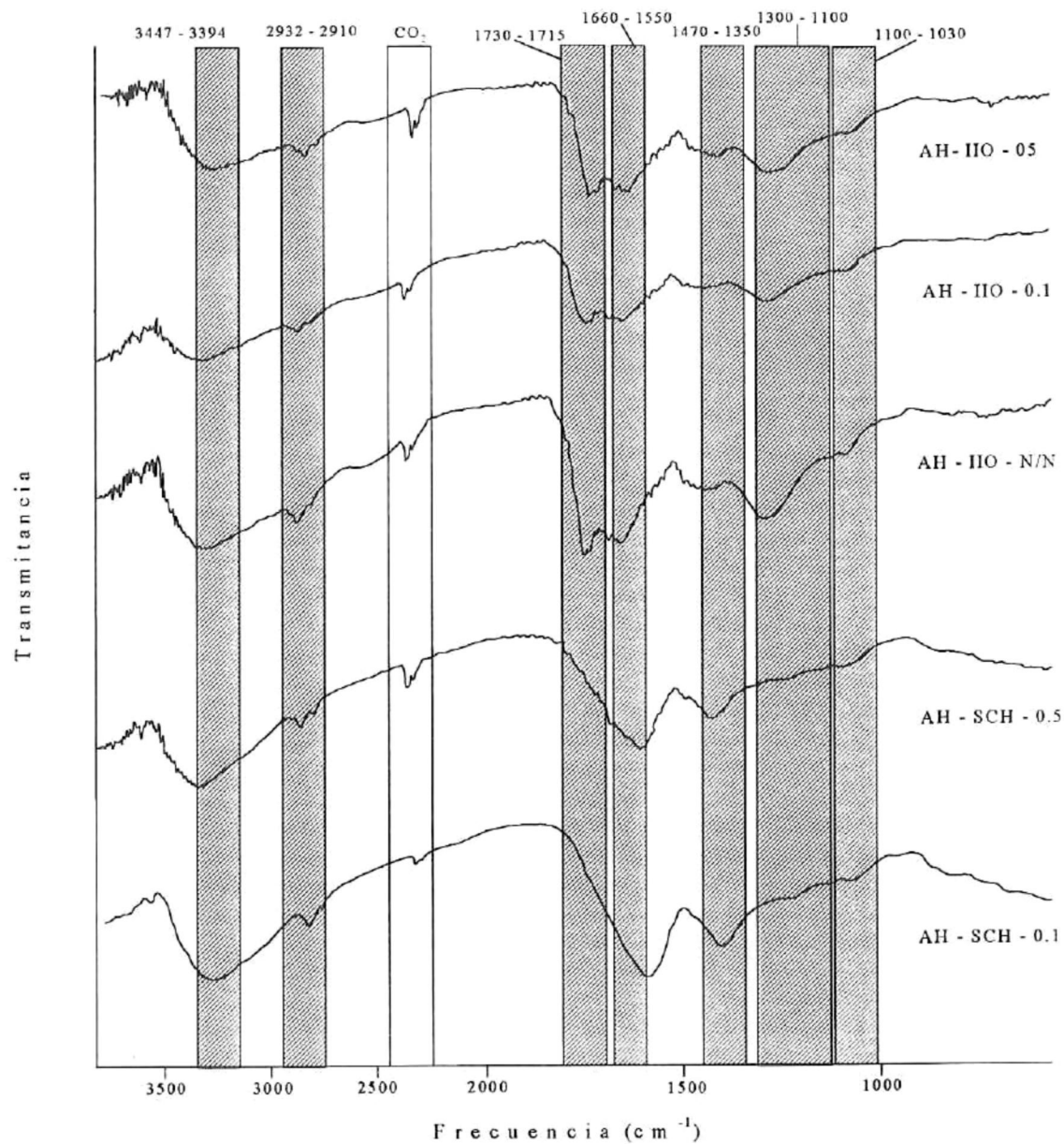


Fig. 8: Espectros IR de AH-H Extraídos por M-IIO y M-SCH. Para el M-IIO: Pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.5M (AH-IIO-0.5); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1M (AH-IIO-0.1); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1 /  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1M (AH-IIO-N/N). Para el M-SCH: pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.5M (AH-SCH-0.5); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1M (AH-SCH-0.1).

Tomando como referencia cuantitativa para cada espectro el pico que se encuentra en el intervalo de frecuencia 2910–2932  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces C-H) de la Fig. 8, se obtuvo lo siguiente: Para la región 3394-3447  $\text{cm}^{-1}$  (grupos OH-libres), Piccolo (1988) menciona que un mayor contenido de OH-libres indica una mayor pureza del extracto. Sin embargo, lo mencionado por este autor no se cumplió al analizar los cinco espectros en general (**M-IIO** y **M-SCH**), ya que el AH-IIO-0.5 fue el extracto más puro, pero el AH-SCH-0.5 fue el que presentó más OH-libres. Entre los AH-H del **M-SCH** sí se cumplió lo indicado por Piccolo (1988). Para los AH-H del **M-IIO** también se hubiera cumplido tal indicación si no fuera por la relación entre el AH-IIO-N/N (más OH-libres y menor pureza) y el AH-IIO-0.1. Esto sugiere que la fracción húmica asociada a cationes trivalentes, y que solamente fué extraída por la solución N/N, es rica en grupos OH. Si lo anterior es cierto, entonces se podría argumentar que el AH-IIO-0.5 (más OH-libres que los dos anteriores) tampoco extrajo la fracción unida a cationes trivalentes, y que por lo tanto debió tener una menor cantidad de OH-libres que el AH-IIO-N/N. Sin embargo la gran diferencia en la pureza de los dos extractos, AH-IIO-0.5 (0.3 %) y AH-IIO-N/N (1.2 %), bien pudo provocar que el AH-IIO-N/N mostrase menos OH-libres, a pesar de estar constituido con más grupos funcionales con OH. Por otro lado, los AH-H del **M-SCH** presentaron más OH-libres que los AH-H del **M-IIO**. Esto sugiere diferencias composicionales en los extractos obtenidos por ambos métodos. Probablemente el tratamiento con HCl/HF durante el **M-SCH** produjo modificaciones composicionales en el AH-natural (Dubach *et al.*, 1964; y Piccolo, 1988). Por su parte, la región 1715-1730  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a enlaces C=O de grupos carboxilos, ésteres, y/o carbonilos (Zhen-Di *et al.*, 1990). El hecho de que solamente los AH-H del **M-IIO** hayan mostrado picos en esta región, sugiere una composición diferente de los extractos obtenidos por los dos métodos. La ausencia de señal en los AH-H del **M-SCH** sugiere que su alto contenido de OH-libres debe provenir de estructuras tipo alcohólicas. Quizas la solución de HCl/HF indujo cambios que dieron lugar a la pérdida parcial de grupos originalmente presentes. Así, pudo suceder que grupos carboxilos se hayan reducido y grupos carbonilos hayan verificado condensación, promoviendo en ambos casos el desarrollo de estructuras tipo alcohólicas. Esto puede explicar tanto el alto contenido de OH-libres, así como la pérdida de enlaces C=O en los

AH-H del **M-SCH**. Entre los AH-H del **M-IIO**, existe una notable diferencia en la cantidad de enlaces C=O del AH-IIO-N/N (mayor cantidad) respecto al AH-IIO-0.1. Asociando este resultado con el contenido de OH-libres, parece resaltarse la riqueza de grupos carboxilos en la fracción húmica extraída solamente por la solución N/N. La región 1550-1660  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a enlaces C=C de estructuras tipo olefinicas (Portal *et al.*, 1986; y Pillon *et al.*, 1986). En los AH-H del **M-SCH** los picos ocurrieron a 1577  $\text{cm}^{-1}$ , y en los del **M-IIO** se presentaron entre 1622-1627  $\text{cm}^{-1}$ . Esta diferencia puede deberse a un efecto de traslape del pico a 1718  $\text{cm}^{-1}$  en los extractos húmicos del **M-IIO**. Los AH-H del **M-SCH** presentaron cantidades significativamente mayores de enlaces C=C, lo cual hace pensar en una producción de los mismos durante el desarrollo del **M-SCH**. Probablemente parte de las estructuras tipo alcohólicas producidas artificialmente, sufrieron deshidratación al encontrarse en el medio ácido de la solución HCl/HF, resultando por tanto en la formación de enlaces C=C. Entre los AH-H del **M-IIO** hay una similitud en los contenidos de enlaces C=C, lo que sugiere que tales cantidades corresponden al contenido real en el AH natural. Para Senesi *et al.*, (1989), la región 1350-1470  $\text{cm}^{-1}$  corresponde a enlaces C-H de estructuras tipo parafínicas. La menor resolución y magnitud en los picos de los extractos húmicos del **M-IIO**, pueden deberse a un efecto de traslape de señales que ocurren solamente en estos AH-H. Asimismo, puede ocurrir que una parte de los enlaces C=C que presumiblemente produjo la solución de HCl/HF, sufrió reacciones de adición con estos ácidos, formando consecuentemente nuevos enlaces C-H parafínicos. La región 1100-1300  $\text{cm}^{-1}$  es asignada a enlaces C-O de grupos carboxílicos, ésteres, y/o éteres (Tan y Giddens, 1972). Si para los AH-H del **M-SCH** asociamos esta asignación, al hecho de que tales extractos no muestran picos en esta región ni en la comprendida entre 1715-1730  $\text{cm}^{-1}$ , parece confirmarse la pérdida de grupos carboxilos en estos AH-H. Debysér *et al.*, (1978) y Piccolo (1988) indican que los picos en la región 1030-1100  $\text{cm}^{-1}$  deben atribuirse a enlaces Si-O de material silíceo, y que el MH con menor pureza mostrará señales más intensas. Sin embargo, esta asociación no se presentó en los extractos obtenidos. Piccolo (1988) hace esta aseveración basado en la intensidad de los picos de submuestras a las que solo había purificado parcialmente. Sin embargo el contenido de ceniza de dichas submuestras era muy diferente (50.0 %, 56.0 %,

8.2 %, 11.8 %, y 11.0 %). Esto provocó que los espectros de las submuestras con 50.0 y 56.0 % ceniza, mostrasen picos ampliamente mayores respecto a las submuestras restantes. Cuando Piccolo completó la purificación, el contenido final de ceniza por muestra analizada fue: 1.0 %, 1.0 %, 2.48 %, 1.1%, y 3.4 %. En esta segunda serie de espectros, no pueden visualizarse diferencias en las señales de los enlaces Si-O, a pesar de tener valores desde 1.0 a 3.4 % ceniza. Basado en estos últimos espectros, el autor concluye que los picos de Si-O son ligeramente notables en los cinco espectros. Dado que la máxima diferencia en el contenido de ceniza de los AH-H de la presente investigación, fué equivalente a la de los AH-H purificados por Piccolo (2.8 y 2.4 respectivamente), se entiende porque no se observan diferencias entre los picos de las submuestras del **M-IIO** y el **M-SCH**. Lo anterior nos lleva a tomar con reserva la relación de que a mayor señal en la región  $1030-1100\text{ cm}^{-1}$  → menor grado de pureza (o mayor contenido de enlaces Si-O) de los extractos húmicos. Al parecer, tal relación solo se manifiesta cuando las diferencias en el contenido de ceniza son amplias. Para finalizar, parece ser que los AH-H del **M-SCH** fueron modificados composicionalmente debido al efecto del HCl/HF. Lo más crítico de esto fue la pérdida de grupos carboxílos, ya que estos marcan la pauta de la reactividad de las moléculas; lo que finalmente se traduce en el papel geoquímico del AH en el medio del cual fue extraído.

### Acido Fúlvico (AF):

#### *Metodología IIO:*

Se muestra la capacidad de extracción de AF-Na por cada solución utilizada, así como las cantidades de CI que van eliminandose por los filtrados. En particular para los AF, las filtraciones en  $0.20\ \mu\text{m}$  se llevan a cabo tanto a pH básico como ácido.

**AF-Na Extraído:**

En el **M-IIO** la fracción fúlvica sedimentaria fue extraída conjuntamente con el AH-Na, por lo cual se obtuvieron al final tres submuestras que utilizaron NaOH 0.5M, NaOH 0.1M, o N/N. Los datos correspondientes al AF-Na extraído se muestran en la Tabla: AF-1 (Apéndice AF). Las Tablas V (a y b) muestran el promedio de extracción, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas V. Resultados de AF-Na Extraído por M-IIO:** (a) *Promedio de AF-Na Extraído (mg.) por cada solución utilizada.* (b) *Pruebas Estadísticas entre las soluciones de extracción.*

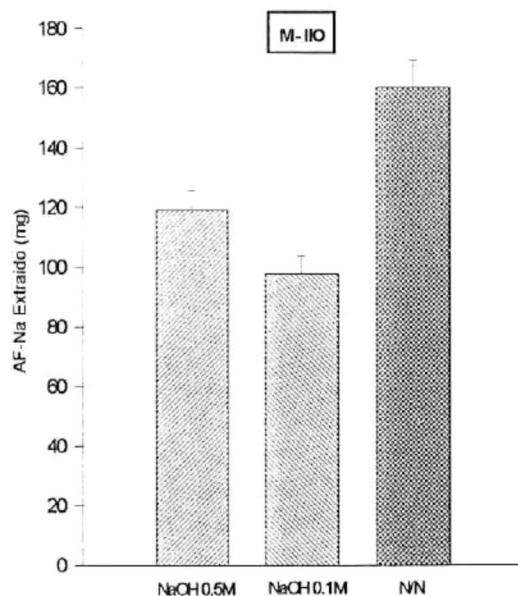
Tabla V.a

Sln. de Extracción	Promedio de AF-Na Extraído (mg.)
NaOH 0.5M	119.1 ± 6.9
NaOH 0.1M	97.8 ± 5.9
N/N	160.1 ± 9.0

Tabla V.b

<i>ANOVA de 1 Vía: P &lt; 0.0001 ⇒ D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: P &lt; 0.05</i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	D.E.S.	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 9: AF-Na Extraído por M-IIO.** Promedio en cantidades extraídas de AF-Na. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v)

De acuerdo a lo encontrado en las Tablas Va y Vb, y a lo que muestra la Fig. 9; la solución de N/N presentó mayor capacidad para extraer la fracción fúlvica. Esta mayor efectividad pudo promoverse por el efecto complejante del ion  $P_2O_7^{4-}$  en los cationes trivalentes unidos a una fracción de AF-sedimentario. Entre las soluciones de NaOH, el AF fue mayormente extraído por la solución con mayor fuerza iónica (0.5M). Esto parece indicar que una fracción del AF, no la unida a cationes trivalentes, no fue hidratada por la solución de molaridad 0.1; sin embargo, es difícil de explicar este resultado. Lo que sí es un hecho es que para el AF, una mayor fuerza iónica del medio no inhibió su solubilización como ocurrió con el AH. Esta diferencia entre los dos materiales puede ser ocasionada por la mayor área superficial, mayor acidez total y mayor reactividad de las moléculas fúlvicas respecto a las húmicas.

**Purificación por filtración:**

Por cada solución extractora se determinó el peso de los CI retenidos a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$  con el medio básico. En particular para el AF, la filtración más fina se realizó también con el medio ácido. Los datos totales de las retenciones se encuentran en las Tablas: AF-2 (para 0.45  $\mu\text{m}$ ), AF-3 (para 0.20  $\mu\text{m}$ -básico), y AF-4 (para 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido); todas ellas en el Apéndice AF. Las Tablas VI.a  $\rightarrow$  VI.h muestran el promedio de CI retenidos, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas VI. Resultados de Purificación por Filtración de AF-Na en M-PIO [a $\rightarrow$ f] y Comparaciones en retenciones en AH-Na y AF-Na [g, h]: (a) Promedio de CI Retenidos (mg.) a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$  (básico y ácido). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones a 0.45  $\mu\text{m}$ , (c) Entre soluciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -básico, (d) Entre soluciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido, (e) Entre retenciones a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ -básico, (f) Entre retenciones a 0.20  $\mu\text{m}$ -básico y 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido, (g) Entre retenciones en AH-Na y AF-Na en 0.45  $\mu\text{m}$ , (h) Entre retenciones en AH-Na y AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -básico.**

Tabla VI.a

Solución de AF-Na:	Promedio de CI Retenidos (mg.)		
	0.45 $\mu\text{m}$	0.20 $\mu\text{m}$ -básico	0.20 $\mu\text{m}$ -ácido
NaOH 0.5M	3.3 $\pm$ 0.4	4.7 $\pm$ 0.3	5.6 $\pm$ 0.4
NaOH 0.1M	3.3 $\pm$ 0.3	4.7 $\pm$ 0.4	5.7 $\pm$ 0.6
N/N	4.2 $\pm$ 0.2	5.5 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.3

Tabla VI.b

Filtración en 0.45 $\mu\text{m}$ :		
<i>Kruskal-Wallis de 1 Vía: P &lt; 0.0001 <math>\Rightarrow</math> D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: P &lt; 0.05</i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

Tabla VI.c

Filtración en 0.20 $\mu\text{m}$ -básico:		
<i>Kruskal-Wallis de 1 Vía: <math>P &lt; 0.0001 \Rightarrow</math> D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: <math>P &lt; 0.05</math></i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	IGUALES	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

Tabla VI.d

Filtración en 0.20 $\mu\text{m}$ -ácido:	
<i>ANOVA de 1 Vía: <math>P &lt; 0.01 \Rightarrow</math> IGUALES</i>	
NaOH 0.5M = NaOH 0.1M = N/N	

Tabla VI.e

Filtraciones: 0.45 $\mu\text{m}$ vs 0.20 $\mu\text{m}$ -básico:	
Sln. de Extracción:	<i>Mann-Whitney: <math>P &lt; 0.0001</math></i>
NaOH 0.5M	D.E.S.
NaOH 0.1M	D.E.S.
N/N	D.E.S.

Tabla VI.f

Filtraciones: 0.20 $\mu\text{m}$ -básico vs 0.20 $\mu\text{m}$ -ácido:		
Sln. de Extracción:	<i>t-Student: <math>P &lt; 0.0001</math></i>	<i>Mann-Whitney: <math>P &lt; 0.0027</math></i>
NaOH 0.5M	D.E.S.	—
NaOH 0.1M	D.E.S.	—
N/N	—	D.E.S.

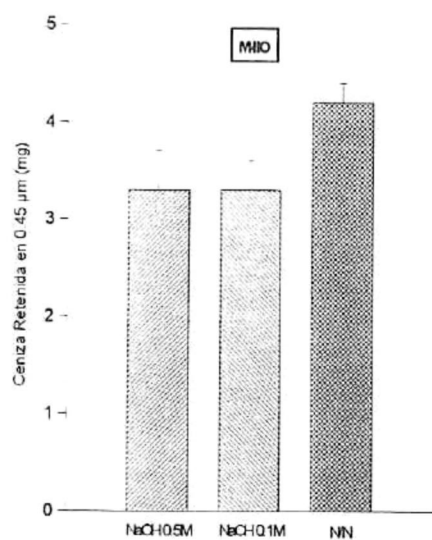
Tabla VI.g

Filtración en 0.45 $\mu\text{m}$ :			
<i>Prueba t-Student: <math>P &lt; 0.0001</math></i>			
Sln. de Extracción:	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	N/N
AH-Na vs AF-Na	D.E.S.	D.E.S.	D.E.S.

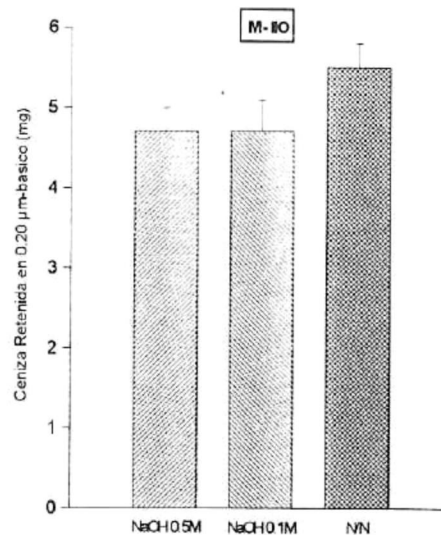
Tabla VI.h

Filtración en 0.20 $\mu\text{m}$ -básico:			
Prueba Estadística:	<i>Mann-Whitney: <math>P &lt; 0.0001</math></i>	<i>t-Student: <math>P &lt; 0.0001</math></i>	
Sln. de Extracción:	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	N/N
AH-Na vs AF-Na	D.E.S.	D.E.S.	D.E.S.

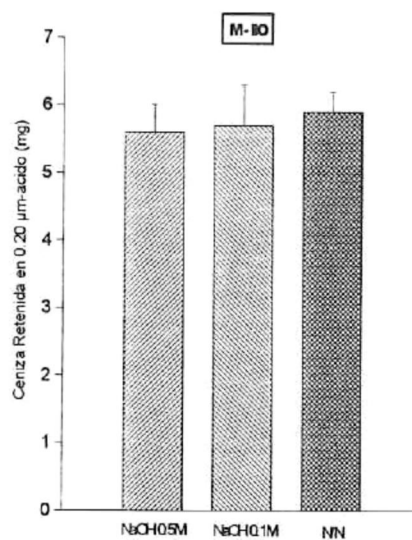
\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 10: Purificación de AF-Na en 0.45μm por M-IIO.** Promedio en compuestos inorgánicos retenidos en 0.45 μm. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v).



**Fig. 11: Purificación de AF-Na en 0.20μm-básico por M-IIO.** Promedio en compuestos inorgánicos retenidos en 0.20 μm-básico. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v).



**Fig. 12: Purificación de AF-Na en 0.20μm-ácido por M-IIO.** Promedio en compuestos inorgánicos retenidos en 0.20 μm-ácido. 20 pseudoréplicas por solución. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v)

De acuerdo a los resultados de las filtraciones básicas (0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ ), la solución de N/N presentó más CI  $> 0.45 \mu\text{m}$  y  $> 0.20 \mu\text{m}$  que las otras soluciones. Tal parece que este excedente inorgánico se incorporó junto con la fracción fúlvica que estuvo asociada a los cationes trivalentes. Entre las submuestras que utilizaron NaOH se obtuvieron equivalencias en las retenciones básicas. Sin embargo el hecho de que al final la submuestra con 0.5M haya mostrado una mayor pureza, indica que la submuestra con 0.1M incorporó más CI  $< 0.20 \mu\text{m}$ . Por su parte los tres filtrados ácidos (pH: 3~4) mostraron retenciones equivalentes de CI. Hecho que sugiere una similitud en el contenido de arcillas expandibles en las tres extracciones. Al parecer, este material arcilloso se constituyó como la única fracción inorgánica retenida en 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido. Sin embargo, las filtraciones ácidas bien pudieron retener AF-Na en los filtros; ya que las asociaciones organo-arcillosas se favorecen a pH's ácidos. Por cada filtración básica (0.45  $\mu\text{m}$  o 0.20  $\mu\text{m}$ ) de cada solución extractora, se comparó la cantidad de CI retenidos en los AH-Na y AF-Na. En todos los casos se obtuvieron mayores retenciones en las filtraciones de las soluciones fúlvicas. Esto indica que el AF se asoció más a las fracciones inorgánicas  $> 0.45 \mu\text{m}$  y  $> 0.20 \mu\text{m}$  que que el AH; hecho posible debido a la mayor reactividad de las moléculas fúlvicas. Por otro lado y por cada solución, se compararon los pesos de los CI retenidos en los filtrados a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$ . Se encontró que para las tres soluciones, dominaron los CI comprendidos entre 0.20-0.45  $\mu\text{m}$  sobre los  $> 0.45 \mu\text{m}$ . Al comparar las retenciones inorgánicas en los dos filtrados a 0.20  $\mu\text{m}$  (ácido y básico) de las tres soluciones de extracción, se encontró en todos los casos que los filtrados ácidos resultaron con mayores retenciones. Esto viene a significar que las filtraciones ácidas resultan más efectivas en la remoción de CI. Asimismo, de acuerdo a las retenciones en todos los filtrados, fueron los minerales de arcilla expandibles los CI dominantes en las tres soluciones. Sin embargo, puede suceder que la fracción inorgánica  $< 0.20 \mu\text{m}$  haya sido más incorporada en las extracciones.

### *Metodología IIO vs Metodología Schnitzer:*

Se comparan los AF-H recuperados por el **M-IIO** y el **M-SCH** (ambos con todas sus soluciones de extracción). Asimismo, se realizan comparaciones en cuanto a los grados de pureza de los extractos fúlvicos, y en los espectros IR de aquellos con menor contenido de ceniza por cada submuestra.

### Recuperación de AF-H:

Ya obtenidos y pesados los AF-H de las submuestras del **M-IIO** y el **M-SCH**, se determinaron y compararon los promedios de recuperación de cada una de ellas. Los datos totales de recuperación de AF-H se encuentran en la Tabla: AF-5 (Apéndice AF). Las Tablas VII (a → d) muestran el promedio de recuperación, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas VII. Resultados de AF-H Recuperado:** (a) Promedio de AF-H Recuperado (mg.) por cada solución utilizada. Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar las recuperaciones en ambos métodos.

Tabla VII.a

Solución de Extracción	Promedio de AF-Na Recuperado (mg)	
	M-IIO	M-SCH
NaOH 0.5M	100.5 ± 7.0	92.4 ± 8.2
NaOH 0.1M	78.7 ± 5.7	117.6 ± 4.6
N/N	138.6 ± 9.2	—

Tabla VII.b

M-IIO:		
ANOVA de 1 Vía: $P < 0.0001 \Rightarrow D.E.S.$		
Prueba de Contrastes de Tukey: $P < 0.05$		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	D.E.S.	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

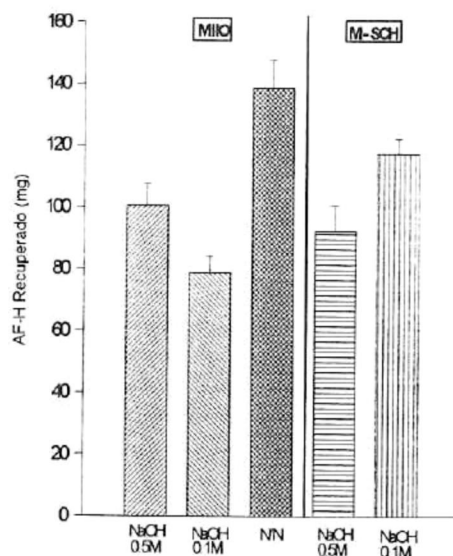
Tabla VII.c

M-SCH :	
Prueba de Mann-Whitney: $P < 0.0001$	
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M
NaOH 0.5M	D.E.S.

Tabla VII.d

M-IIO vs M-SCH		
Sln. de Extracción:	<i>t-Student: P &lt; 0.0042</i>	<i>t-Student: P &lt; 0.0001</i>
NaOH 0.5M	D.E.S.	—
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 13: AF-H Recuperado por M-IIO y M-SCH.** Promedio en cantidades recuperadas de AF-H. [M-IIO] : 20 pseudoréplicas por solución. [M-SCH] : 14 pseudoréplicas en NaOH 0.5M, y 13 pseudoréplicas en NaOH 0.1M. N/N = NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v).

De acuerdo a lo obtenido en las Tablas VIIa → VIId, y a lo que se observa en la Fig. 13; se encuentra que aplicando el **M-IIO** y utilizando la solución de N/N, se recupera una mayor cantidad de AF-H. Por su parte, al aplicar el **M-SCH** se obtiene más AF-H si la solución extractora es NaOH 0.1M. Asimismo, al comparar las cantidades fúlvicas recuperadas con NaOH 0.5M en los dos métodos, se encontró que durante el desarrollo del **M-IIO** se dió una menor pérdida de AF (-Na y/o -H) respecto al **M-SCH**, aún cuando el primero involucró una mayor manipulación. Sin embargo, con la solución de NaOH 0.1M se obtuvo una mayor pérdida en el **M-IIO**. Es difícil de explicar tal resultado, ya que

si se argumentara que el **M-IIO** involucró mayor manipulación, y por tanto, mayor pérdida de AF (-Na y/o -H), entonces se hubiese encontrado lo mismo para la submuestra que utilizó NaOH 0.5M. Posiblemente la Amberlita XAD-8 retuvo cantidades “relativamente grandes” del AF extraído con NaOH 0.1M. Sin embargo, esto nos lleva a una nueva problemática de explicar porque dicha retención ocurrió solamente con el AF extraído con NaOH 0.1M.

### **Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos:**

Se determinó el contenido de ceniza de las pseudorélicas, se calcularon los promedios de todas las submuestras y se compararon entre sí. Los datos totales de contenido de ceniza de los extractos fúlvicos se encuentran en la Tabla: AF-6 (Apéndice AF). Las Tablas VIII (a → d) muestran el promedio de ceniza, y los resultados de las pruebas estadísticas realizadas entre las soluciones utilizadas.

**Tablas VIII. Resultados de la Fracción Inorgánica en los Extractos Fúlvicos: (a)** *Contenido promedio de ceniza (en %) en los AF-H (por cada solución utilizada). Pruebas Estadísticas: (b) Entre soluciones por M-IIO, (c) Entre soluciones por M-SCH, (d) Para comparar los contenidos de ceniza en ambos métodos.*

Tabla VIII.a

Solución de Extracción	Contenido promedio de ceniza (en %) del AF-H	
	M-IIO	M-SCH
NaOH 0.5M	2.8 ± 0.3	4.4 ± 0.2
NaOH 0.1M	3.8 ± 0.6	4.3 ± 0.1
N/N	4.4 ± 0.4	—

Tabla VIII.b

M-IIO :		
<i>Kruskal-Wallis de 1 Vía: P &lt; 0.0001 ⇒ D.E.S.</i>		
<i>Prueba de Contrastes de Tukey: P &lt; 0.05</i>		
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M	N/N
NaOH 0.5M	D.E.S.	D.E.S.
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

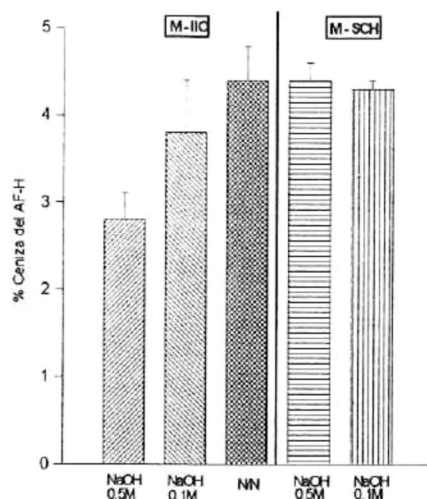
Tabla VIII.c

M-SCH :	
<i>Prueba t-Student: P &lt; 0.1785</i>	
Sln. de Extracción:	NaOH 0.1M
NaOH 0.5M	IGUALES

Tabla VIII.d

M-IIO vs M-SCH		
Sln. de Extracción:	<i>t-Student</i> : $P < 0.0001$	<i>Mann-Whitney</i> : $P < 0.0027$
NaOH 0.5M	D.E.S.	—
NaOH 0.1M	—	D.E.S.

\* D.E.S. = Diferencias Estadísticamente Significativas



**Fig. 14: Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos por M-IIO y M-SCH.** Promedio en grados de pureza de AF-H, obtenido por cada solución de extracción utilizada. [M-IIO] : 20 pseudoréplicas en soluciones de NaOH, y 19 pseudoréplicas en N/N. [M-SCH] : 14 pseudoréplicas en NaOH 0.5M, y 13 pseudoréplicas en NaOH 0.1M. N/N = NaOH 0.1M /  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  0.1M (1:1 v/v).

A partir de estos resultados y de los obtenidos en las filtraciones básicas de los AF-Na por el M-IIO, se obtuvo que la solución de N/N incorporó mucho mayores cantidades de CI que las soluciones de NaOH. Asimismo, la solución de NaOH 0.5M produjo la fracción fúlvica de mayor pureza. Para los AF-H obtenidos con las dos soluciones extractoras por el M-SCH se presentó un nivel de purificación equivalente. Tal hecho parece significar que las cantidades de CI incorporados a ambas soluciones fueron similares, aún cuando las cantidades recuperadas de AF-H hallan sido sustancialmente mayores al utilizar NaOH 0.1M. Contrariamente a lo encontrado para el AH-H, y a lo mencionado por Schnitzer (1982), de este resultado se infiere que una mayor fuerza iónica de la solución extractora no implica necesariamente una mayor pureza del AF-H. Sin embargo, se obtienen menores

cantidades del mismo con la solución de NaOH 0.5M (tal como menciona este autor). Por otro lado, al comparar la pureza de los extractos fúlvicos obtenidos por las dos metodologías, se obtuvo que al utilizar la misma solución, el **M-IIO** fue más efectivo para producir AF-H de mayor pureza.

### **Espectros IR de AF-H:**

Al igual que lo realizado para los AH-H, en cada submuestra del **M-IIO** y el **M-SCH** se escogió la pseudoréplica con menor cantidad de ceniza, y se preparó para determinar su espectro de IR. Asimismo, los espectros se compararon entre sí para determinar posibles diferencias composicionales entre los extractos fúlvicos. Los AF-H utilizados para este análisis espectral fueron:

**M-IIO** : Submuestra con NaOH 0.5M  $\Rightarrow$  Pseudoréplica # 8 (% Ceniza = 2.4)

**M-IIO** : Submuestra con NaOH 0.1M  $\Rightarrow$  Pseudoréplica # 1 (% Ceniza = 2.8)

**M-IIO** : Submuestra con N/N  $\Rightarrow$  Pseudoréplica # 6 (% Ceniza = 4.1)

**M-SCH** : Submuestra con NaOH 0.5M  $\Rightarrow$  Pseudoréplica # 5 (% Ceniza = 4.1)

**M-SCH** : Submuestra con NaOH 0.1M  $\Rightarrow$  Pseudoréplica # 2 (% Ceniza = 4.0)

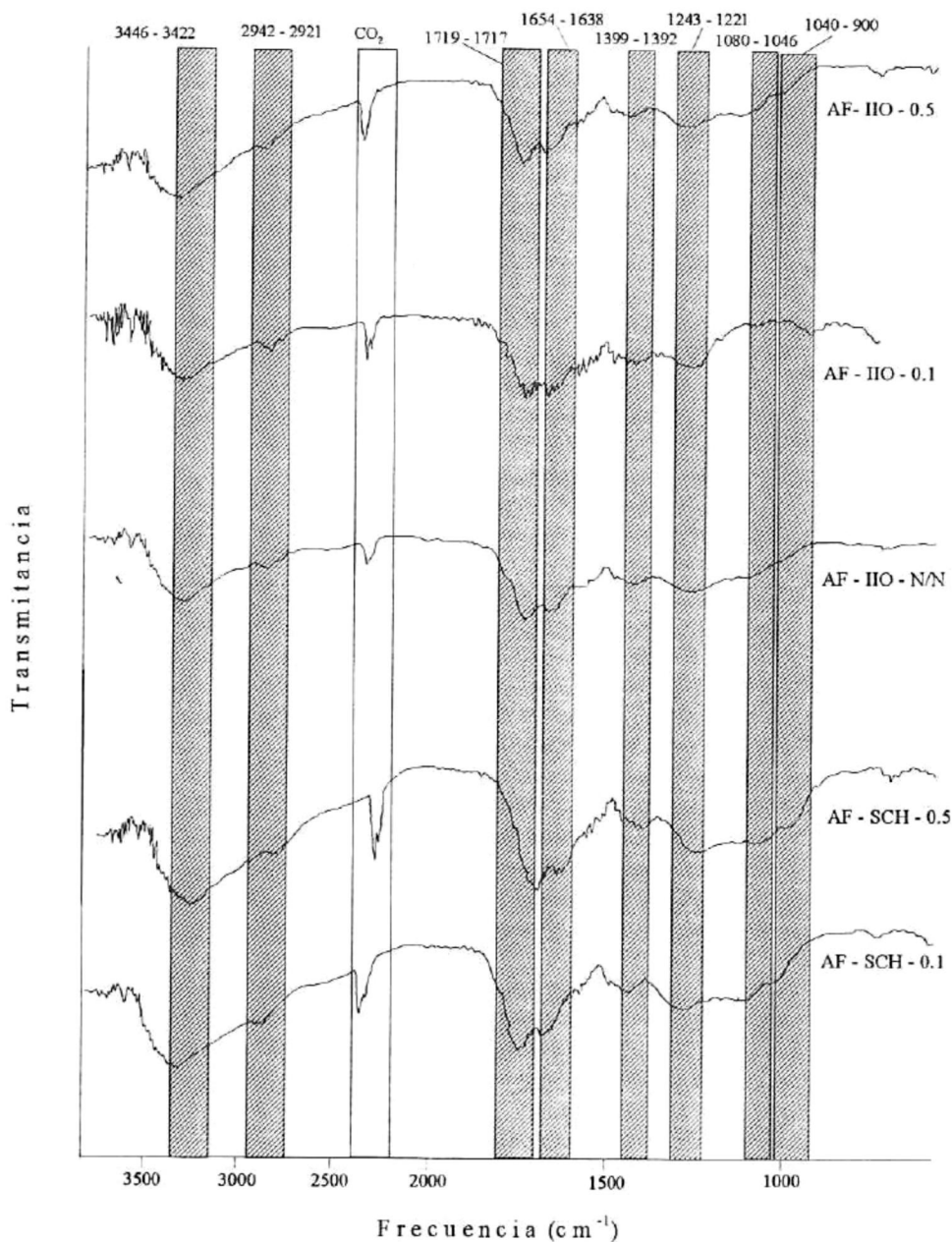


Fig. 15: **Espectros IR de AF-H Extraídos por M-IIO y M-SCH.** Para el **M-IIO**: Pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.5M (**AF-IIO-0.5**); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1M (**AF-IIO-0.1**); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1 / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (**AF-IIO-N/N**). Para el **M-SCH**: pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.5M (**AF-SCH-0.5**); pseudoréplica de submuestra con NaOH 0.1M (**AF-SCH-0.1**).

Tomando el pico que se encuentra en el intervalo de frecuencia 2921-2942  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces C-H) de la Fig. 15, como referencia cuantitativa para cada espectro, se encontró lo siguiente: Para la región 3422-3446  $\text{cm}^{-1}$  se observó que los AF-H del **M-SCH** mostraron diferencias significativas en su contenido de OH-libres (más para AF-SCH-0.1). Sin embargo, ambos presentaron mayores cantidades que los AF-H del **M-IIO** obtenidos de las soluciones de NaOH. En el AF-IIO-N/N se encontró una cantidad equivalente al AF-SCH-0.5. Posiblemente el mayor contenido de OH-libres en los extractos fúlvicos del **M-SCH**, se deba a la presencia de MO-lábil e hidrofílica enriquecida en OH de carboxilos pertenecientes a hidroxiaácidos, ácidos urónicos, etc.. Si esto es válido, entonces podríamos pensar que la purificación del AF-IIO-N/N por cromatografía de adsorción fue menos efectiva que para los otros AF-H del **M-IIO**. Sin embargo, también puede suceder que la composición de la fracción fúlvica asociada a los cationes trivalentes sea rica en OH. En los AF-H no se encontró la relación mencionada por Piccolo (1988), quien sugiere que a mayor contenido de OH-libres, mayor grado de pureza de la fracción orgánica total. De hecho esta fue contraria, ya que las tres submuestras con más OH-libres fueron, a la vez, las más impuras. En la región 1717-1719  $\text{cm}^{-1}$  se encontró que los AF-H del **M-SCH** contienen mayores cantidades de enlaces C=O que los tres AF-H del **M-IIO**. Esto parece confirmar la presencia de MO-lábil e hidrofílica enriquecida con grupos carboxilos en los AF-H del **M-SCH**. El hecho de que el AF-SCH-0.1 mostrase más enlaces C=O y una mayor recuperación de material que el AF-SCH-0.5, sugiere que la solución de NaOH 0.1M extrajo una fracción fúlvica adicional. Aunque también pudo haber sucedido que la MO-lábil que acompañó al AF-SCH-0.1 fue mayor. Entre los AF-H del **M-IIO**, el extraído con N/N mostró más enlaces C=O. Lo cual puede deberse a una purificación orgánica limitada, o a una composición rica en grupos carboxilos en la fracción fúlvica asociada a los cationes trivalentes. Tanto en la región 1638-1654  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces C=C de estructuras tipo olefinicas) como en la región 1392-1399  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces C-H de estructuras tipo parafinicas), se encontraron equivalencias cuantitativas en las cinco submuestras. Esto indicó que tanto la MO-lábil asociada a los AF-H del **M-SCH** (y quizás al AF-IIO-N/N) así como la fracción fúlvica previamente enlazada a cationes trivalentes, no presentaron ambos tipos de enlaces. Por tanto, las cantidades mostradas por todas las

submuestras constituyen una parte de la composición de las moléculas fúlvicas (y no de MO-lábil). Asimismo, las tres soluciones tuvieron la misma capacidad para extraer la fracción fúlvica que presentaba en su composición tales estructuras. En la región 1221-1243  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces C-O de grupos carboxilos), las submuestras mostraron el mismo ordenamiento cuantitativo que en la región 3422-3446  $\text{cm}^{-1}$ . Este resultado parece reafirmar algunas ideas expuestas con anterioridad: 1) la existencia de diferencias composicionales entre los extractos fúlvicos que se obtuvieron por las dos metodologías; 2) la presencia de MO-lábil e hidrofílica enriquecida en grupos carboxilos de hidroxiácidos, ácidos urónicos, etc...; 3) la posibilidad de una purificación orgánica menos efectiva en el AF-IIO-N/N respecto a las otras submuestras del **M-IIO**; 4) la posibilidad de que la composición de la fracción fúlvica que se asoció a los cationes trivalentes pudiese ser rica en grupos carboxilos. Al igual que lo encontrado para los AH-H, en la región 1046-1080  $\text{cm}^{-1}$  (enlaces Si-O de material silíceo) tampoco se encontró que los AF-H con mayor contenido de ceniza (o mayor contenido de enlaces Si-O) mostraran picos más intensos. De aquí se concluye que en espectrometría IR, la región 1030-1100  $\text{cm}^{-1}$  no ayuda a distinguir entre una mayor o menor pureza de los extractos fúlvicos (o húmicos) que presenten pequeñas diferencias en su contenido de impurezas inorgánicas (ceniza). De los dos tipos de MH, solo los AF-H mostraron señales en la región 900-1040  $\text{cm}^{-1}$ , a la cual Senesi *et al.*, (1989) relacionan con enlaces C-O y O-H de carbohidratos simples. De estos, solo se manifestaron los AF-H del **M-SCH**, y ligeramente el AF-IIO-0.5. En base a esto, podemos suponer que tales enlaces forman parte de la MO-lábil que acompañó al material fúlvico durante el proceso de extracción. Por otra parte, anteriormente se mencionó la posibilidad de que las altas señales del AF-IIO-N/N en las regiones 3422-3446 y 1717-1719  $\text{cm}^{-1}$  podrían deberse a una limitada purificación orgánica. Sin embargo, al ver que dicha submuestra no mostró señal en la región 900-1040  $\text{cm}^{-1}$ , entonces parece ser que su alto contenido en grupos carboxilos se debió a la naturaleza de la fracción fúlvica que se asoció a los cationes trivalentes.

## RESULTADOS COMPARATIVOS:

Aquí se realizan comparaciones en el grado de pureza del MH (AH-H y AF-H) obtenido con el M-IIO contra el reportado en la bibliografía (usando otros métodos). El M-IIO, M-P, y M-SCH de la bibliografía (M-SCH<sup>B</sup>) se consideran más de una vez, ya que estas metodologías han utilizado más de una solución de extracción.

### Acido Húmico (AH):

#### Metodología IIO vs Otras Metodologías de la Bibliografía:

Los datos totales de contenido de ceniza de los AH-H obtenidos por los diferentes métodos se encuentran en la Tabla: AH-6 (Apéndice AH). Las Tablas IX (a → g) y la Fig. 16, muestran resultados comparativos entre diferentes metodologías. Dado que existen métodos de los cuales solo se pudo recopilar un solo dato, la comparación de estos con el M-IIO (y sus tres variantes) solo se basó en el valor del dato en sí, y por tanto, no se realizaron pruebas estadísticas (*Metodologías Bibliográficas con un dato*). Por su parte los métodos que presentaron más de un dato, fueron comparados con el M-IIO mediante pruebas estadísticas (*Metodologías Bibliográficas con más de un dato*).

**Tablas IX. Resultados Comparativos en la Pureza de AH-H Obtenidos por M-IIO y Otras Metodologías de la Bibliografía:** (a) Promedio del contenido de ceniza en AH-H obtenidos por diferentes métodos. (b) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (c) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (d) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (e) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (f) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M. (g) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M.

Tabla IX.a

Método:	M-K	M-HyO	M-OdeS	M-PyF	M-NyK	M-M	M-PyM	M-IHSS	M-M.F
<i>n</i> :	58	2	5	1	8	4	3	15	3
Contenido promedio de ceniza (%)	5.2 ± 2.8	1.2 ± 0.6	2.0 ± 2.2	12.2 -	6.7 ± 4.7	0.7 ± 0.5	3.2 ± 1.2	1.4 ± 1.3	4.9 ± 1.2

Método:	M-SCH <sup>B</sup> 0.5M	M-SCH <sup>B</sup> 0.1M	M-IIO 0.1M	M-IIO 0.5M	M-IIO N/N	M-P 0.5M	M-P Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M	M-P Acetona	M-P DMSO	M-P DMF
<i>n</i> :	8	6	20	20	20	1	1	1	1	1
Contenido promedio de ceniza (%)	1.1 ± 0.4	1.1 ± 0.5	1.3 ± 0.2	0.5 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.0 -	1.0 -	3.4 -	2.48 -	1.1 -

*Metodologías Bibliográficas con un dato:*

Pureza Similar: **M-IIO** (0.1M y N/N)  $\approx$  **M-P** (0.5M, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M, y DMF).

Inconvenientes: **M-P** usa HCl/HF  $\rightarrow$  altera la composición del AH.

Mayor Pureza: **M-IIO** 0.5M.

*Metodologías Bibliográficas con más de un dato:*

Tabla IX.b

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M</i>		
<b>M-K</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-NyK</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-PyM</b> ( $P < 0.007$ )
<b>M-M.F</b> ( $P < 0.007$ )	<b>M-M</b> ( $P < 0.0163$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup></b> 0.5M ( $P < 0.0306$ )

\* **M-SCH<sup>B</sup>** 0.1M  $\rightarrow$  Prueba t-Student / Otros Métodos  $\rightarrow$  Prueba de Mann-Whitney

Métodos de Mayor Pureza que M-IIO 0.1M: **M-M** y **M-SCH<sup>B</sup>** 0.5M.

Inconvenientes: **M-M** usa Diálisis  $\rightarrow$  pérdida de fracciones de bajos pesos moleculares.

**M-SCH<sup>B</sup>** 0.5M utiliza HCl/HF.

Tabla IX.c

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M</i>	
<b>M-HyO</b> ( $P < 0.909$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup></b> 0.1M ( $P < 0.1144$ )
<b>M-OdeS</b> ( $P < 0.5185$ )	<b>M-IHSS</b> ( $P < 0.2174$ )

\* Todos los Métodos  $\rightarrow$  Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: **M-HyO** realiza congelado/descongelado del AH  $\rightarrow$  destruye propiedades intrínsecas del mismo. Los otros tres métodos usan HCl/HF. **M-OdeS** y **M-IHSS** utilizan Diálisis.

Tabla IX.d

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO N/N</i>		
<b>M-K</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-M.F</b> ( $P < 0.007$ )	<b>M-PyM</b> ( $P < 0.007$ )
<b>M-M</b> ( $P < 0.0032$ )		<b>M-NyK</b> ( $P < 0.0001$ )
<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.1M</b> ( $P < 0.0207$ )		<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.5M</b> ( $P < 0.0047$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Métodos de Mayor Pureza que M-IIO N/N: **M-M** y **M-SCH<sup>B</sup> 0.1M y 0.5M.**

Inconvenientes: **M-M** utiliza Diálisis. **M-SCH<sup>B</sup> 0.1M y 0.5M** usan HCl/HF.

Tabla IX.e

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO N/N</i>		
<b>M-IHSS</b> ( $P < 0.0989$ )	<b>M-OdeS</b> ( $P < 0.5184$ )	<b>M-HyO</b> ( $P < 0.909$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: **M-HyO** recurre al congelado/descongelado del AH. Los otros dos métodos utilizan Diálisis y HCl/HF.

Tabla IX.f

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M</i>		
<b>M.F</b> ( $P < 0.007$ )	<b>M-K</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-NyK</b> ( $P < 0.0001$ )
<b>M-HyO</b> ( $P < 0.0298$ )	<b>M-IHSS</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-PyM</b> ( $P < 0.007$ )
<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.1M</b> ( $P < 0.0001$ )		<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.5M</b> ( $P < 0.0001$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

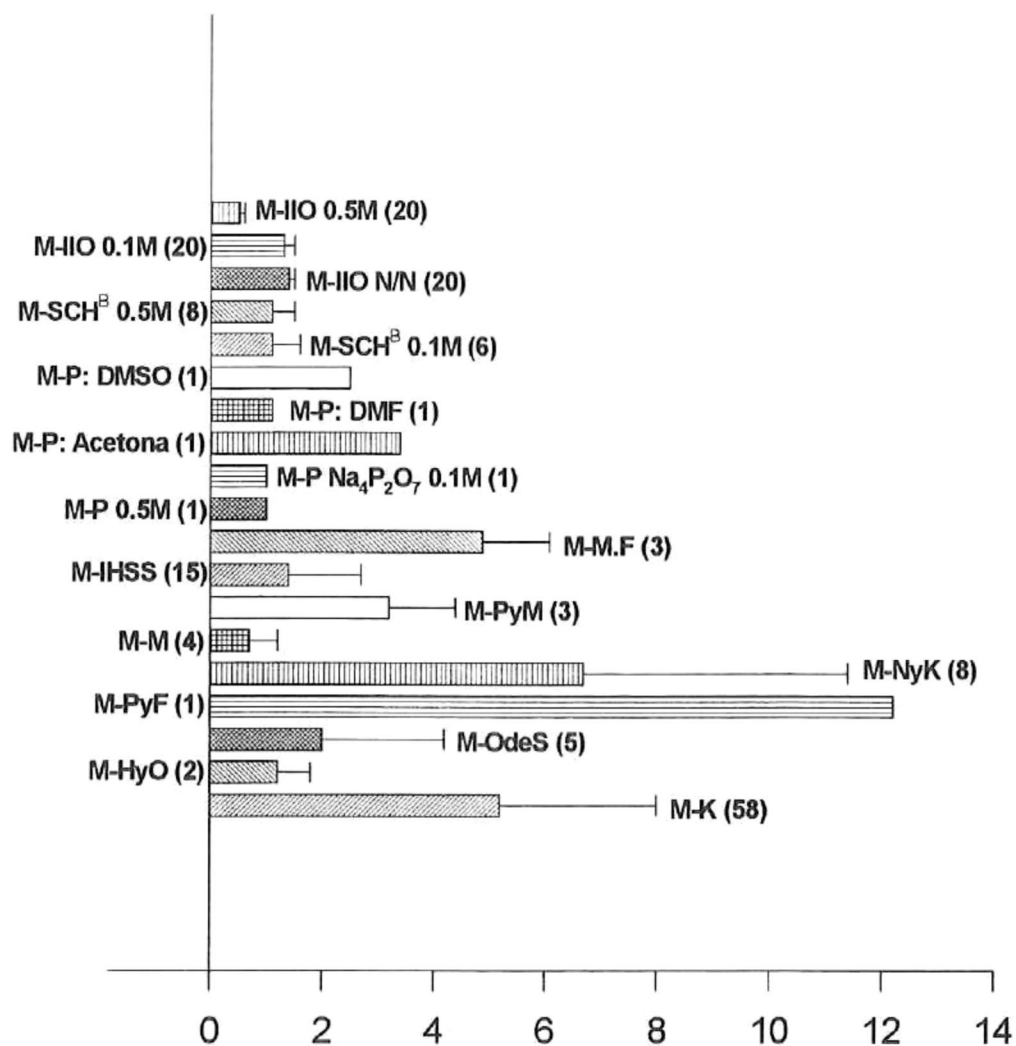
Métodos de Mayor Pureza que M-IIO 0.5M: No Hay.

Tabla IX.g

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M</i>	
<b>M-OdeS</b> ( $P < 0.083$ )	<b>M-M</b> ( $P < 0.6418$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: **M-OdeS** utiliza HCl/HF. Los dos métodos realizan Diálisis.



Contenido promedio de ceniza (en %) en AH's obtenidos por distintos métodos de purificación

Fig. 16 : Fracción Inorgánica en Extractos Húmicos obtenidos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía. Los números entre paréntesis representan el número de datos disponibles por cada método.

De acuerdo a los resultados obtenidos en las Tablas IX, y a lo observado en la Fig. 16; se encontró que el **M-IIO-0.5M**, el **M-OdeS**, y el **M-M** tuvieron la misma capacidad de purificación inorgánica. Además, estos métodos se constituyeron como los más convenientes para alcanzar tal objetivo. Sin embargo el **M-OdeS** y el **M-M** muestran inconvenientes de otra índole. Así, en el **M-OdeS** se utiliza la solución de HCl/HF, la cual promueve alteraciones composicionales en el AH-natural. Asimismo, tanto el **M-OdeS** como el **M-M** recurren a la diálisis, misma que produce pérdidas de las fracciones húmicas de menores tamaños y pesos moleculares, y que representan las moléculas de mayor reactividad. A primera instancia pareciera que el **M-IIO-0.5M** es la mejor opción metodológica para obtener AH. Sin embargo el NaOH 0.5M fue selectivo al momento de extraer este material. A nuestro juicio el **M-IIO-N/N** es el más recomendable, ya que se extrae una fracción húmica más representativa y no provoca mayores alteraciones composicionales. Aún cuando el **M-IIO-0.5M** produjo los extractos húmicos de mayor pureza, tal parece que realizando una limpieza más exhaustiva (*e.g.*, ciclos ácido  $\leftrightarrow$  base e intercambio catiónico) en el **M-IIO-N/N** se alcanzaría el mismo nivel de purificación.

### **Acido Fúlvico (AF):**

#### **Metodología IIO vs Otras Metodologías de la Bibliografía:**

Los datos totales en el contenido de ceniza de los extractos fúlvicos obtenidos por las diferentes metodologías se encuentran en la Tabla: AF-7 (Apéndice AF). Las Tablas X (a  $\rightarrow$  g) y la Fig. 17, muestran resultados comparativos entre diferentes metodologías. Al igual que en el AH, las comparaciones del **M-IIO** con los métodos con un solo dato se encuentran en: *Metodologías Bibliográficas con un dato*. Asimismo, las comparaciones cuando los métodos presentaron más de un dato están en: *Metodologías Bibliográficas con más de un dato*.

**Tablas X. Resultados Comparativos en la Pureza de AF-H Obtenidos por M-IIO y Otras Metodologías de la Bibliografía:** (a) Promedio del contenido de ceniza en AF-H obtenidos por diferentes métodos. (b) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (c) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M. (d) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (e) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO N/N. (f) Métodos que mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M. (g) Métodos que No mostraron D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M.

Tabla X.a

Método:	M-K	M-OdeS	M-NyK	M-M	M-IHSS	M-PyM	M-H
n:	14	3	1	5	2	3	9
Contenido promedio de ceniza (%)	10.5 ± 2.8	9.1 ± 3.7	8.3 -	4.6 ± 5.8	2.2 ± 1.9	5.1 ± 1.8	1.8 ± 0.8

Método:	M-SCH <sup>B</sup> 0.1M	M-SCH <sup>B</sup> 0.5M	M-IIO 0.1M	M-IIO 0.5M	M-IIO N/N
n:	5	8	20	20	19
Contenido promedio de ceniza (%)	3.3 ± 3.0	1.6 ± 0.6	3.8 ± 0.6	2.8 ± 0.3	4.4 ± 0.4

*Metodologías Bibliográficas con un dato:*

Pureza Similar: No Hay.

Mayor Pureza: M-IIO 0.5M

*Metodologías Bibliográficas con más de un dato:*

Tabla X.b

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M</i>		
M-K ( $P < 0.0001$ )	M-OdeS ( $P < 0.0071$ )	M-M ( $P < 0.045$ )
M-H ( $P < 0.0001$ )	M-SCH <sup>B</sup> 0.5M ( $P < 0.0001$ )	

\* M-H y M-SCH<sup>B</sup> 0.5M → Prueba t-Student / Otros Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Métodos de Mayor Pureza que M-IIO 0.1M: M-H y M-SCH<sup>B</sup> 0.5M.

Inconvenientes: Los dos métodos no eliminan la MO-lábil.

Tabla X.c

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.1M</i>		
M-PyM ( $P < 0.2012$ )	M-IHSS ( $P < 0.1231$ )	M-SCH <sup>B</sup> 0.1M ( $P < 0.359$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: M-SCH<sup>B</sup> 0.1M no elimina MO-lábil. Los otros dos métodos usan Diálisis.

Tabla X.d

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO N/N</i>		
<b>M-K</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-OdeS</b> ( $P < 0.0073$ )	<b>M-M</b> ( $P < 0.0464$ )
<b>M-H</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-IHSS</b> ( $P < 0.0265$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.5M</b> ( $P < 0.0001$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Métodos de Mayor Pureza que M-IIO N/N: **M-H**, **M-IHSS**, y **M-SCH<sup>B</sup> 0.5M**.

Inconvenientes: **M-IHSS** utiliza Diálisis. Los otros dos métodos no eliminan la MO-lábil.

Tabla X.e

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO N/N</i>	
<b>M-PyM</b> ( $P < 0.6665$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.1M</b> ( $P < 0.2703$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: **M-PyM** utiliza Diálisis. **M-SCH<sup>B</sup> 0.1M** no elimina la MO-lábil.

Tabla X.f

<i>Métodos que mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M</i>		
<b>M-K</b> ( $P < 0.0001$ )	<b>M-OdeS</b> ( $P < 0.0071$ )	<b>M-M</b> ( $P < 0.045$ )
<b>M-H</b> ( $P < 0.003$ )	<b>M-PyM</b> ( $P < 0.0071$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.5M</b> ( $P < 0.0001$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Métodos de Mayor Pureza que M-IIO 0.5M: **M-H** y **M-SCH<sup>B</sup> 0.5M**.

Inconvenientes: Los dos métodos no eliminan la MO-lábil.

Tabla X.g

<i>Métodos que No mostraron: D.E.S. respecto al M-IIO 0.5M</i>	
<b>M-IHSS</b> ( $P < 0.9544$ )	<b>M-SCH<sup>B</sup> 0.1M</b> ( $P < 0.5186$ )

\* Todos los Métodos → Prueba de Mann-Whitney

Inconvenientes: **M-IHSS** utiliza Diálisis. **M-SCH<sup>B</sup> 0.1M** no elimina la MO-lábil.

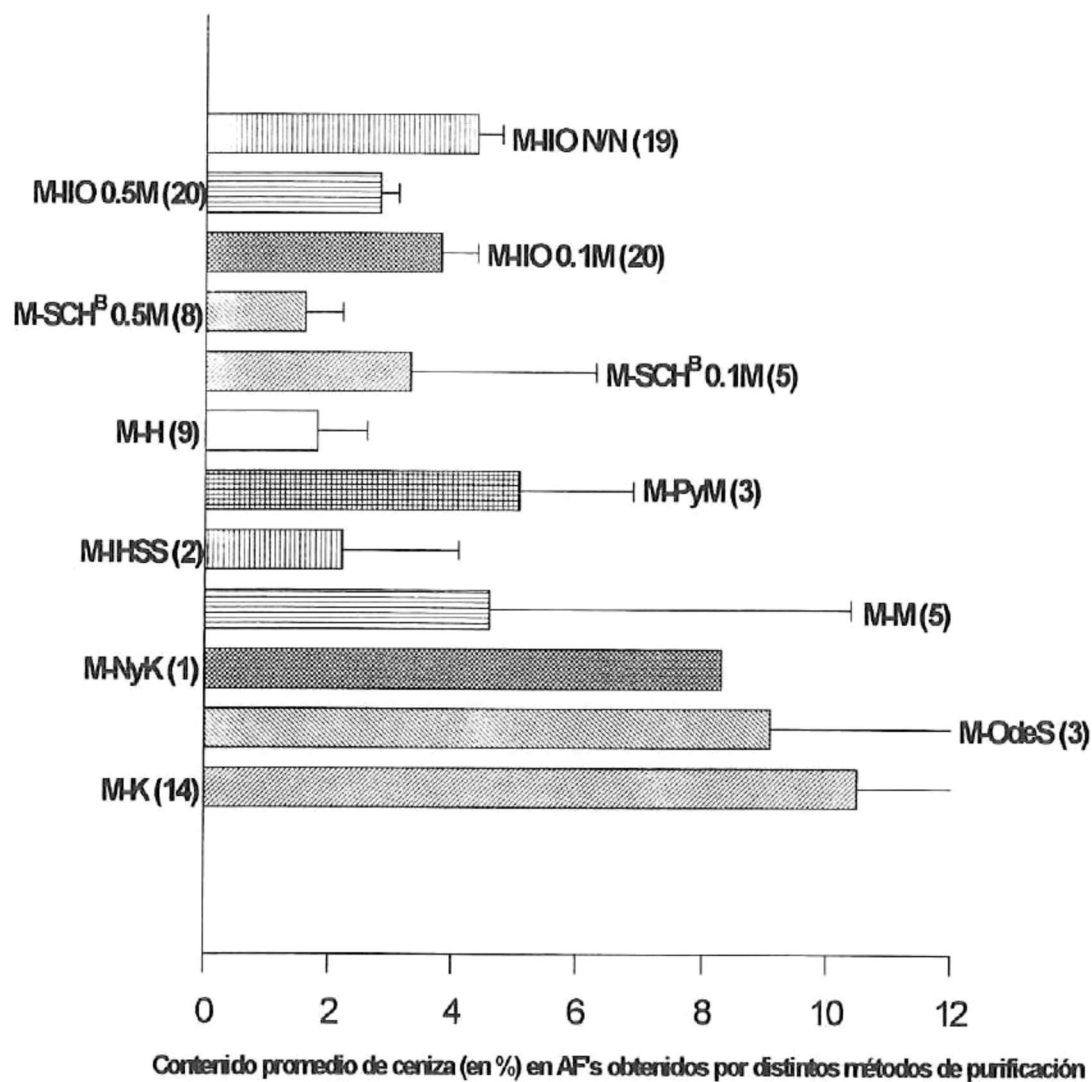


Fig. 17: *Fracción Inorgánica en Extractos Fúlvicos obtenidos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía.* Los números entre paréntesis representan el número de datos disponibles por cada método.

Entre los AF-H del **M-IIO** los de mayor pureza fueron los extraídos con NaOH 0.5M. Sin embargo, de acuerdo a las Tablas X y a la Fig. 17; al comparar el **M-IIO-0.5M** vs metodologías de la bibliografía, se observó que el **M-H** y el **M-SCH<sup>B</sup> 0.5M** tuvieron mayor capacidad de purificación inorgánica. Aún así, estos dos métodos no realizan un tratamiento específico para eliminar MO-lábil que se incorpora durante la extracción. Por otra parte, el **M-IHSS** y el **M-SCH<sup>B</sup> 0.1M** mostraron ser equivalentes al **M-IIO-0.5M**. De cualquier manera, el primero utiliza la diálisis con la subsecuente pérdida de fracciones de bajos pesos moleculares, y el segundo no realiza una limpieza orgánica. Aún con esto, el **M-IIO-N/N** es más conveniente que el **M-IIO-0.5M** ya que extrae una muestra fúlvica más representativa, y el problema de la pureza puede resolverse con un intercambio catiónico más exhaustivo. Hay que aclarar sin embargo, que aún cuando el **M-H** no utilice un tratamiento específico para remover MO-lábil, su exhaustivo intercambio catiónico auxilia en su eliminación. Al parecer, si el **M-H** utilizara la solución de N/N entonces extraería fracciones fúlvicas equivalentes al **M-IIO-N/N**, y se constituiría por tanto como un método más apropiado para la obtención de fracciones fúlvicas altamente representativas y de muy alta pureza de CI. Sin embargo, si el **M-IIO-N/N** realizara un intercambio catiónico tan exhaustivo como el **M-H**, entonces sería más conveniente; ya que contempla un tratamiento específico para eliminar la MO-lábil que se incorpora durante la extracción.

## V. CONCLUSION

El material húmico representa la fracción orgánica más importante de los medios acuáticos y sedimentarios. Aún cuando se constituya como el material orgánico de mayor abundancia en los mismos, su importancia realmente radica en el papel que juega en la geoquímica de la región en que se encuentra. Sin embargo para evaluar correctamente este papel, es necesario caracterizarlo habiendolo obtenido con una mínima alteración composicional y con altos grados de pureza orgánica e inorgánica. Debido a que los métodos conocidos hasta el presente no cumplen satisfactoriamente con uno o ambos de

los requisitos mencionados, el objetivo del presente trabajo fue desarrollar una nueva metodología (**M-IIO**) que cumpliera tales condiciones. Al evaluar al **M-IIO** con tres soluciones de extracción, se determinó que la mejor opción es la de utilizarlo con la solución NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v). Aún cuando los extractos húmicos y fúlvicos de la misma no presentaron los mayores grados de pureza (pero pueden mejorarse con un intercambio catiónico exhaustivo), esta fue capaz de extraer fracciones húmicas y fúlvicas que no fueron obtenidas con las otras soluciones. Por otra parte, la recuperación de ácido húmico fue de 97.5 % y para el ácido fúlvico de 83.8 %. Esta baja recuperación de la fracción fúlvica pudo deberse a retenciones en los filtros, particularmente en las filtraciones ácidas y/o durante la cromatografía de adsorción, aunque visualmente no se evidenció una adsorción irreversible en la Amberlita XAD-8. Por otro lado, al comparar al **M-IIO-N/N** con la otra metodología desarrollada (**M-SCH**) y con métodos de la bibliografía, este siguió constituyéndose como la mejor opción para obtener la fracción húmica. Para la fracción fúlvica continuó considerándose al **M-IIO-N/N**. Aún así, dado que el **M-H** muestra una mayor efectividad para eliminar fracciones inorgánicas, parece ser que si utilizara la solución: NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v), entonces su capacidad extractora equivaldría a la del **M-IIO-N/N**, y se constituiría por tanto como un método más apropiado para obtener fracciones fúlvicas altamente representativas y de muy alta pureza de compuestos inorgánicos. Sin embargo, si en el **M-IIO-N/N** se realizara un intercambio catiónico tan exhaustivo como en el **M-H**, entonces sería la metodología más conveniente; ya que contempla un tratamiento específico para eliminar la MO-lábil que se incorpora durante la extracción.

## VI. LITERATURA CITADA

- Aiken, G.R., 1985. Isolation and Concentration Techniques for Aquatic Humic Substances. Cap. 14. En: Aiken, G.R., McKnight, D.M., y Wershaw, R.L., (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. John Wiley and Sons.
- Aiken, G.R., Thurman, E.M., y Malclom, R.L., 1979. Comparison of XAD Macroporous Resins for the Concentration of Fulvic Acid from Aqueous Solution. *Analytical Chemistry*, 51 (11): 1799-1803.
- Baker, W.E., 1986. An Application of Soil Humic Substances to Geochemical Exploration. *Applied Geochemistry*, 1: 307-310.
- Barnes, M.A., Barnes, W.C., y Bustin, R.M., 1984. Diagenesis 8. Chemistry and Evolution of Organic Matter. *Geoscience Canada*, 11 (3): 103-114.
- BIO-RAD. Life Science Research Products. 1991. (Catálogo).
- Buffle, J., 1990. The Analytical challenge posed by fulvic and humic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 232: 1-2.
- Calderoni, G., y Schnitzer, M., 1984. Effects of Age on the Chemical Structure of Paleosol Humic Acids and Fulvic Acids. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 48: 2045-2051.
- Calvert, S.E., Mukherjee, S., y Morris, R.J., 1985. Trace Metals in Fulvic and Humic Acids from Modern Organic-Rich Sediments. *Oceanologica Acta*, 8 (2): 167-173.
- Chen, Y., y Schnitzer, M., 1976. Viscosity Measurements on Soil Humic Substances. *Soil Science Society American Journal*, 40: 866-872.
- Cronin, J.R., y Morris, R.J., 1982. The Occurrence of High Molecular Weight Humic Material in Recent Organic-Rich Sediment from the Namibian Shelf. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 15: 17-27.
- Debyser, Y., Gadel, F., Leblond, R., Martin, R., y Burglin, C., 1978. Géochimie des Kérogènes dans les sédiments. *Géochimie Organique des Sédiments Marins Profonds*. En: Orgon IV, CNRS – Paris.
- Dubach, P., Mehta, N.C., Jakab, T., Martin, F., y Roulet, N., 1964. Chemical Investigations on Soil Humic Substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 28: 1567-1578.
- Eglinton, G., y Barnes, P.J., 1978. Organic Matter in Aquatic Sediments. En: Krumbein, W.E. (Ed.). *Environmental Biogeochemistry and Geomicrobiology*. 1: 25-45.
- Fengler, G., Haupt, E.T.K., y Liebezeit, G., 1989. Humic Substances in Holocene Sediments of the Skagerrak (NE North Sea) and the Elbe River. *The Science of the Total Environment*. 81/82: 335-342.

- Forsyth, W.G.C., y Fraser, G.K., 1947. Freezing as an Aid in the Drying and Purification of Humus and Allied Materials. *Nature*, 160: 607.
- Francois, R., 1987. A Study of the Extraction Conditions of Sedimentary Humic Acids to Estimate their True *In Situ* Sulfur Content. *Limnology and Oceanography*, 32 (4): 964-972.
- Frizado, J.P., 1979. Ion Exchange on Humic Materials – a Regular Solution Approach. En: *Chemical Modeling in Aqueous Systems*. E. Jenne (Ed.). pag. 133-145. American Chemical Society Symposium Series 93, American Chemical Society, Washington, U.S.A.
- Ghosh, K., y Schnitzer, M., 1980. Macromolecular Structures of Humic Substances. *Soil Science*, 129 (5): 266-276.
- Gonzalez-Vila, F.J., Martin, F., Del Rio, J.C., y Fründ, R., 1992. Structural Characteristics and Geochemical Significance of Humic Acids Isolated from Three Spanish Lignite Deposits. *The Science of the Total Environment*, 117/118: 335-343.
- Haddad, R.I., Rohrbach, B.G., y Kaplan, I.R., 1990. Hydrofluoric Acid Induced Alterations of Sedimentary Humic Acid. pag. 416-425. En: Ittekkot, V., Kempe, S., Michelis, W., y Spitzzy, A. (Eds.). *Facets of Modern Biogeochemistry*. Springer-Verlag.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Dennis, L.W., y Maciel, G.E., 1983. Solid <sup>13</sup>C-NMR of Sedimentary Humic Substances: New Revelations on their Chemical Composition. Cap. 3. En: Christman, R.F., y Gjessing, E.T. (Eds.). *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science.
- Hatcher, P.G., Breger, I.A., Maciel, G.E., y Szeverenyi, N.M., 1985. Geochemistry of Humin. Cap. 11. En: Aiken, G.R., McKnight, D.M., y Wershaw, R.L. (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. John Wiley and Sons.
- Hayase, K., y Tsubota, H., 1983. Sedimentary Humic Acid and Fulvic Acid as Surface Active Substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 47: 947-952.
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S., Wardle, R.E., y Brown, J.K., 1975. Humic Materials from an Organic Soil: A Comparison of Extractants and of Properties of Extracts. *Geoderma*, 13: 231-245.
- Hayes, M.H.B., 1985. Extraction of Humic Substances from Soil. Cap. 13. En: Aiken, G.R., McKnight, D.M., y Wershaw, R.L. (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. John Wiley and Sons.
- Holtzclaw, K.M., Sposito, G., y Bradford, G.R., 1976. Analytical Properties of the Solubles, Metal-Complexing Fractions in Sludge-Soil Mixtures: I. Extraction and Purification of Fulvic Acid. *Soil Science Society American Journal*, 40: 254-258.
- Hopner, T., y Orliczek, C., 1978. Humic Matter as a Component of Sediments in Estuaries. En: *Biogeochemistry of Estuarine Sediments*. E.D. Goldberg (Ed.). UNESCO, pag. 70-74.

- Hori, S., y Okuda, A., 1961. Purification of Humic Acid by the Use of Ion Exchange Resin. *Soil Science and Plant Nutrition*, 7 (1): 4.
- Inbar, Y., Chen, Y., y Hadar, Y., 1990. Humic Substances Formed During the Compositing of Organic Matter. *Soil Science Society American Journal*, 54: 1316-1323.
- Jakobsen, S.T., 1992. Chemical Reactions and Air Change During Decomposition of Organic Matters. *Resources, Conservation and Recycling*, 6: 259-266.
- Kononova, M.M., 1982. Métodos de Estudio de la Materia Orgánica del Suelo. Cap. VII. En: Kononova, M.M., (Ed.). *Materia Orgánica del Suelo: Su Naturaleza, Propiedades, y Métodos de Investigación*. Oikos-Tau, S.A. - Ediciones. Barcelona, España.
- Kieber, R.J., Zhou, X., y Mopper, K., 1990. Formation of Carbonyl Compounds from UV-Induced Photodegradation of Humic Substances in Natural Waters: Fate of Riverine Carbon in the Sea. *Limnology and Oceanography*, 35 (7): 1503-1515.
- King, L.H., 1967. Isolation and Characterization of Organic Matter from Glacial-Marine Sediments on the Scotian Shelf. Bedford Institute of Oceanography. *Technical Report 67-4*: 1-17. Canada.
- Kipton, H., Powell, J., y Town, R.M., 1992. Solubility and Fractionation of Humic Acid: Effect of pH and Ionic Medium. *Analytica Chimica Acta*, 267: 47-54.
- Livens, F.R., 1991. Chemical Reactions of Metals with Humic Material. *Environmental Pollution*, 70: 183-208.
- Lobartini, J.C., Tan, K.H., Asmussen, L.E., Leonard, R.A., Himmelsbach, D.S, y Gingle, A.R., 1991. Chemical and Spectral Differences in Humic Matter from Swamps, Streams and Soils in the Southeastern United States. *Geoderma*, 49: 241-254.
- Lobartini, J.C., Tan, K.H., Rema, J.A., Gingle, A.R., Pape, C., y Himmelsbach, D.S., 1992. The Geochemical Nature and Agricultural Importance of Commercial Humic Matter. *The Science of the Total Environment*, 113: 1-15.
- MacCarthy, P., Peterson, M.J., Malcolm, R.L., y Thurman, E.M., 1979. Separation of Humic Substances by pH Gradient Desorption from a Hydrophobic Resin. *Analytical Chemistry*, 51 (12): 2041-2043.
- Malcolm, R.L., 1968. Freeze-Drying of Organic Matter, Clays, and Other Earth Materials. *U. S. Geological Survey Prof. Paper 600-C*: C211-C216.
- Malcolm, R.L., 1976. Method and Importance of Obtaining Humic and Fulvic Acids of High Purity. *Journal Research U. S. Geological Survey*, 4 (1): 37-40.

- Malcolm, R.L., 1989. Factors to be Considered in the Isolation and Characterization of Aquatic Humic Substances. Session I: Isolation, Fractionation, and Characterization. pp. 9-36. En: B. Allard, H. Borén, y Grimvall, A. (Eds.). *Humic Substances in the Aquatic and Terrestrial Environment* – Proceedings of an International Symposium, Linköping, Sweden, August 21-23, 1989 – Lecture Notes in Earth Sciences 33. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
- Malcolm, R.L., 1990. The Uniqueness of Humic Substances in Each of Soil, Stream, and Marine Environments. *Analytica Chimica Acta*, 232: 19-30.
- Nissenbaum, A., y Kaplan, I.R., 1972. Chemical and Isotopic Evidence for the *in situ* origin of marine humic substances. *Limnology and Oceanography*, 17: 570-582.
- Nissenbaum, A., y Swaine, D.J., 1976. Organic Matter-Metal Interactions in Recent Sediments: The Role of Humic Substances. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 809-816.
- Ortiz de Serra, M.I., y Schnitzer, M., 1972. The Chemistry of Humic and Fulvic Acids Extracted from Argentine Soils – I. Analytical Characteristics. *Soil Biology and Biochemistry*, 5: 281-286.
- Picard, G.L., y Felbeck, G.T., 1976. The Complexation of Iron by Marine Humic Acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 1347-1350.
- Piccolo, A., 1988. Characteristics of Soil Humic Extracts Obtained by Some Organic and Inorganic Solvents and Purified by HCl–HF Treatment. *Soil Science*, 146 (6): 418-426.
- Piccolo, A., Rausa, R., y Celano, G., 1992. Characteristics of Molecular Size Fractions of Humic Substances Derived from Oxidized Coal. *Chemosphere*, 24 (9): 1381-1387.
- Pignalosa, V., Scialdone, R., y Ramunni, A., 1991. Decomposition of Fulvic Acids by Incubation in a Soil Water–Extract Under Various Conditions of Oxygen Availability. *Agrochimica*, XXXV–1-2-3: 126-134.
- Pillon, P., Portal, J.M., Gerard, B., Jeanson, P., y Jocteur-Monrozier, L., 1986. Oxygen-Containing Functional Groups in Land-Derived Humic Acids–II. Changes in the Oxygen Distribution of Humic Acids During Early Diagenesis as Revealed by Derivatization Methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 313-319.
- Plummer, D.T., 1981. Métodos de Separación Cromatográfica. Cap. 3. En: Plummer, D.T. (Ed.). *Introducción a la Bioquímica Práctica*. Editorial McGraw–Hill Latinoamericana, S.A.
- Portal, J.M., Pillon, P., Jeanson, P., y Gerard, B., 1986. Oxygen-Containing Functional Groups in Land-Derived Humic Acids–I. Evaluation by Derivatization Methods. *Soil Biology and Biochemistry*, 19: 305-311.
- Poutanen, E.L., y Morris, R.J., 1983. The Occurrence of High Molecular Weight Humic Compounds in the Organic–Rich Sediments of the Peru Continental Shelf. *Oceanologica Acta*, 6 (1): 21-28.

- Rashid, M.A., 1971. Role of Humic Acids of Marine Origin and their Different Molecular Weight Fractions in Complexing di- and tri-valent metals. *Soil Science*, 11 (5): 298-306.
- Rashid, M.A., 1985. *Geochemistry of Marine Humic Compounds*. New York, Berlin, Heidelberg, Tokyo. Springer-Verlag. pp. 300.
- Rashid, M.A., y King, L.H., 1969. Molecular Weight Distribution Measurements on Humic and Fulvic Acid Fractions from Marine Clays on the Scotian Shelf. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 33: 147-151.
- Rashid, M.A. y King, L.H. 1970. Major Oxygen-Containing Functional Groups Present in Humic and Fulvic Acid Fractions Isolated from Contrasting Marine Environments. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 34: 193-201.
- Rashid, M.A., y King, L.H., 1971. Chemical Characteristics of Fractionated Humic Acids Associated with Marine Sediments. *Chemical Geology*, 7: 37-43.
- Reid, P.M., Wilkinson, A.E., Tipping, E., y Jones, M.N., 1990. Determination of Molecular Weights of Humic Substances by Analytical (UV Scanning) Ultracentrifugation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 54: 131-138.
- Rice, J.A., y MacCarthy, P., 1989. Isolation of Humin by Liquid-Liquid Partitioning. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 61-69.
- Schnitzer, M., 1982. Organic Matter Characterization. Cap. 30. En: Page, A.L., Miller, R.H., y Keeney, D.R. (Eds.). *Methods of Soil Analysis. Part 2: Chemical and Microbiological Properties*. Second Edition. Series Agronomy. American Society of Agronomy, Inc. Soil Science Society of America, Inc.
- Senesi, N., Miano, T.M., Provenzano, M.R., y Brunetti, G., 1989. Spectroscopic and Compositional Comparative Characterization of I.H.S.S. Reference and Standard Fulvic and Humic Acids for Various Origins. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 143-156.
- Sholkovitz, E.R., 1976. Flocculation of Dissolved Organic and Inorganic Matter During Mixing of River Water and Sea Water. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 831-845.
- Sohn, M., y Hughes, M.C., 1981. Metal Ion Complex Formation Constants of Some Sedimentary Humic Acids with Zn (II), Cu (II), Cd (II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 45: 2393-2399.
- Snoeyink, V.L., y Jenkins, D., 1990. Química de Coordinación. Cap. 5. En: Snoeyink, V.L., y Jenkins, D. (Eds.). *Química del Agua*. Editorial Limusa, México, D.F.
- Stevenson, F.J., 1985. Geochemistry of Soil Humic Substances. Cap. 2. En: En: Aiken, G.R., McKnight, D.M., y Wershaw, R.L., (Eds.). *Humic Substances in Soil, Sediment and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization*. John Wiley and Sons.

- Stevenson, F.J., y Butler, J.H.A., 1969. Chemistry of Humic Acids and Related Pigments. En: *Organic Geochemistry*. G. Eglinton y M.T.J. Murphy (Eds.). pp. 534-557. Springer-Verlag, New York.
- Stevenson, I.L., y Schnitzer, M., 1982. Transmission Electron Microscopy of Extracted Fulvic and Humic Acids. *Soil Science*, 133: 179-185.
- Tan, K.H., y Giddens, J.E., 1972. Molecular Weights and Spectral Characteristics of Humic and Fulvic Acids. *Geoderma*, 8: 221-229.
- Tan, K.H., Lobartini, J.C., Himmelsbach, D.S., y Asmussen, L.E., 1991. Composition of Humic Acids Extracted Under Air and Nitrogen Atmosphere. *Communications Soil Science Plant Anal.*, 22 (9 y 10): 861-877.
- Tan, K.H., Himmelsbach, D.S., y Lobartini, J.C., 1992. The Significance of Solid-State  $^{13}\text{C}$  NMR Spectroscopy of Whole Soil in the Characterization of Humic Matter. *Communications Soil Science Plant Anal.*, 23 (13 y 14): 1513-1532.
- Thurman, E.M., 1985. *Organic Geochemistry of Natural Waters*. Dordrecht, Boston, Lancaster. Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers. pp. 497.
- Thurman, E.M., Malcolm, R.L., y Aiken, G.R., 1978. Prediction of Capacity Factors for Aqueous Organic Solutes Adsorbed on a Porous Acrylic Resin. *Analytical Chemistry*, 50 (6): 775-778.
- Thurman, E.M., y Malcolm, R.L., 1981. Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances. *Environmental Science & Technology*, 15 (4): 463-466.
- Thurman, E.M., y Malcolm, R.L., 1983. Structural Study of Humic Substances: New Approaches and Methods. Cap. 1. En: Christman, R.F., y Gjessing, E.T. (Eds.). *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science.
- Tschapek, M., y Wasowski, C., 1976. The Surface Activity of Humic Acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 40: 1343-1345.
- Vasconcelos, M.T.S.D., Santos, A.P.L.M.G., y Machado, A.A.S.C., 1989. Evidence of Conformational Changes in Fulvic Acids from Dialysis. *The Science of the Total Environment*, 81/82: 489-499.
- Wenda, C., Xiangquan, Q., Lijun, H., y Minghou, J., 1987. Studies on Marine Humic Substances II. Isolation of Humic Substances from Marine Sediments and their Physical and Chemical Properties. *Oceanologia et Limnologica Sinica*, 18 (4): 364-370.
- Wershaw, R.L., Pinckney, D.J., Llaguno, E.C., y Vicente-Beckett, V., 1990. NMR Characterization of Humic Acid Fractions from Different Philippine Soils and Sediments. *Analytica Chimica Acta*, 232: 31-42.
- Yariv, S., y Cross, H., 1979. *Geochemistry of Colloid Systems*. Berlin, Germany. Springer-Verlag. pp. 450.

- Yonebayashi, K., y Hattori, T., 1990. A New Fractionation of Soil Humic Acids by Adsorption Chromatography. *Geoderma*, 47: 327-336.
- Yunqian, T., Ming, G., y Bing, L., 1986. Humic Substances in Sediments. *Acta Oceanologica Sinica*, 5 (2): 235-246.
- Zhen-Di, W., Bhuvan, C. P., y Cooper, H. L., 1990. Spectroscopic and Structural Characterization of a Laurentian Fulvic Acid: Notes on the Origin of the Color. *Analytica Chimica Acta*, 232: 43-49.

## *Apéndices*

## **LISTA DE APENDICES :**

### **DIAGRAMA DE FLUJO DEL M-IIO:**

### **DIAGRAMA DE FLUJO DEL M-SCH:**

### **TABLAS DE RESULTADOS:**

#### **Acidos Húmicos (AH):**

- Tabla AH-1 : *AH-Na Extraído por M-IIO*  
Tabla AH-2 : *Purificación de AH-Na en 0.45  $\mu\text{m}$  por M-IIO*  
Tabla AH-3 : *Purificación de AH-Na en 0.20  $\mu\text{m}$  por M-IIO*  
Tabla AH-4 : *AH-H Recuperado por M-IIO y M-SCH*  
Tabla AH-5 : *Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y M-SCH*  
Tabla AH-6 : *Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía*

#### **Acidos Fúlvicos (AF):**

- Tabla AF-1 : *AF-Na Extraído por M-IIO*  
Tabla AF-2 : *Purificación de AF-Na en 0.45  $\mu\text{m}$  por M-IIO*  
Tabla AF-3 : *Purificación de AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -básico por M-IIO*  
Tabla AF-4 : *Purificación de AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido por M-IIO*  
Tabla AF-5 : *AF-H Recuperado por M-IIO y M-SCH*  
Tabla AF-6 : *Fracción Inorgánica del Extractos Fúlvicos por M-IIO y M-SCH*  
Tabla AF-7 : *Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía*

### **ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS METODOS QUE EXTRAEN MH-SEDIMENTARIO:**

### **MARCO TEORICO CONCEPTUAL DEL M-IIO:**

- *Liofilización del Sedimento*
- *Limpieza Acida Previa del Sedimento*
- *Problemática en la Influencia Luminica*
- *Atmósfera Inerte*
- *Soluciones de Extracción*
- *Centrifugación*
- *Filtración*
- *Ciclos Acido-Base*
- *Cromatografía de Adsorción*
- *Cromatografía de Intercambio Catiónico*
- *Liofilización de Extractos Fúlvicos y Húmicos*

**INCONVENIENTES DE LAS METODOLOGIAS PREVIAS:**

- *Limpieza Orgánica Previa del Sedimento*
- *Neutralización del Sedimento*
- *Congelado-Descongelado*
- *Purificación con HCl/HF*
- *Diálisis*
- *Preconcentración*

## Diagrama de Flujo del M-IIO:

sedimento total liofilizado

sedimento total homogenizado

sedimento para extraer MH (100 grs/réplica)

lavar con HCl 0.1M, ajuste del pH $\approx$ 1-2 con HCl 12M (gotas), agitar 12 h, asentar 24 h. (*elimina carbonatos , evita degradación biológica*).

sifoneo sln HCl, lavado exhaustivo con H<sub>2</sub>O destilada hasta pH $\approx$ 7, asentar 24 h, sifoneo del sobrenadante, liofilizar el sedimento (*neutralización del sedimento*)

todos los pasos siguientes con lo mínimo de luz posible. (*disminución en posible degradación de MH*)

en bolsa con atm N<sub>2</sub>: sln extracción\* (previo burbujeo con N<sub>2</sub>)+sedimento [10:1 p/v], agitar 24 h, asentar 24 h. (*elimina O<sub>2</sub> , extracción de MH*). \*NaOH 0.1M, NaOH 0.5M, NaOH 0.1M/Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (1:1 v/v)

sln AH-Na/AF-Na sifoneada a vaso, burbujeada con N<sub>2</sub>, centrifugada a 17,500 rpm/10 min. (*eliminación de O<sub>2</sub> , separación sedimento-solución AH-Na/AF-Na, eliminación de una fracción inorgánica*)

Sln. AH-Na/AF-Na decantada a vaso, burbujeada con N<sub>2</sub>. Agitar y aplicar HCl 12M (gotas) hasta un pH $\approx$ 1-2. (*eliminación de O<sub>2</sub> , coagulación y formación de suspensión de AH-Na/AF-Na*).

suspensión de AH-Na/AF-Na centrifugada a 17,500 rpm/10 min. (*precipitación del AH-Na*)

precipitado: AH-Na

solución: AF-Na

extraído de tubos con el mínimo de NaOH 0.1M, y a vaso, burbujeado con N<sub>2</sub> , agitación y aplicación de HCl 12M (en gotas) hasta un pH $\approx$ 1-2, reposar 10 min, centrifugar 17,500 rpm/5 min, sln decantada-desechada. [ lo anterior es 1 ciclo ácido-base ]. (realizar 5 ciclos ácido-base). (*elimina O<sub>2</sub> , eliminación de una fracción inorgánica*).

decantada en kitsato, en liofilizador y preconcentración, descongelado, con ayuda de H<sub>2</sub>O desionizada llevarla a vaso chico, liofilizado, registro del peso (*cantidad de AF-Na extraído* )

el AH-Na que quedó precipitado después del 5<sup>to</sup> ciclo ácido-base, se extrae de tubos con el mínimo de sln. de NaOH 0.1M, y a vaso chico, burbujeado con N<sub>2</sub>, liofilizado, registro del peso del AH-Na (*eliminación de O<sub>2</sub> , cantidad de AH-Na extraído por solución extractora*).

disolución del AF-Na en NaOH 0.1M a [ $\leq$  0.30 mg/ml], burbujeado con N<sub>2</sub> (*máxima concentración que evita coagulación del AF-Na, eliminación de O<sub>2</sub>* ).

disolución del AH-Na en NaOH 0.1M a [ $\leq$  0.25 mg/ml], burbujeado con N<sub>2</sub> (*máxima concentración que evita coagulación del AH-Na, eliminación de O<sub>2</sub>* ).

los siguientes dos recuadros para AH-Na y AF-Na ( por separado ).

## Diagrama de Flujo del M-IIO (continua).....

[filtro de nitrato de celulosa de 0.45  $\mu\text{m}$  (lavado exhaustivo con  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada, secado, registro del peso)].  
Sln AH-Na (AF-Na) se filtra, burbujeada con  $\text{N}_2$  . secado de filtro, registro del peso. *(elimina MO-lábil en filtro, elimina  $\text{O}_2$  , cantidad de inorgánicos retenidos en 0.45  $\mu\text{m}$ , elimina una fracción inorgánica).*

igual que el recuadro anterior pero con filtro de 0.2  $\mu\text{m}$ . [ para AF-Na es 0.2  $\mu\text{m}$  - básico ]

AH-Na

AF-Na

Columna con Dowex 50W-X8, AH-Na eluido en columna (flujo  $\rightarrow$  goteo), efluente ( $\text{pH} \approx 3-5$ ) colectado en kitasato. *(elimina fracción de MO-lábil y fracción inorgánica por intercambio catiónico).*

sln. de AF-Na con agitación y aplicando HCl 12M (en gotas) hasta obtener un  $\text{pH} \approx 3-4$ . ( *maximización del volumen de los minerales de arcilla expandibles* ).

suspensión del kitasato a liofilizador y preconcentración, descongelado, y con la ayuda de  $\text{H}_2\text{O}$  desionizada a vaso chico, liofilizado, registro del peso. ( *obtención y cantidad final de AH-H recuperado* ).

igual que el recuadro de filtración en 0.2  $\mu\text{m}$ -básico, pero aquí sin burbujeo de  $\text{N}_2$ . [será 0.2  $\mu\text{m}$ -ácido]

AH-H en desecador, al vacío, en oscuridad ( *se preserva de humedad, se evita degradación* )

sln. de AF-Na con agitación y aplicando HCl 12M (en gotas) hasta obtener un  $\text{pH}=2$ . *(neutralización de grupos funcionales polares*

Fracción para espectroscopía IR. [ *para determinar características composicionales del AH-H (por cada sln. de extracción)*].

Columna con Amberlita XAD-8, sln. AF-Na eluida por columna (flujo  $\rightarrow$  goteo) y primer efluente desechado, paso de NaOH 0.1M por columna y efluente recibido en vaso chico (hasta obtener un efluente incoloro). *(elimina una fracción de MO-lábil por cromatog. de adsorción)*

Fracción para el % ceniza. *(determinación del grado de pureza de AH-H obtenidos)* .

sln. de AF-Na burbujeada con  $\text{N}_2$ , liofilizada *(elimina  $\text{O}_2$  , obtención de AF-Na que pasará por columna de intercambio catiónico).*

igual que el recuadro de disolución del AF-Na

igual a todos los procedimientos que siguen al recuadro marcado:

AH-Na

## Diagrama de Flujo del M-SCH:

sedimento total liofilizado      sedimento total homogenizado      sedimento para extraer MH (100 grs/réplica)

lavar con HCl 0.1M. ajuste del pH≈1-2 con HCl 12M (gotas), agitar 12 h, asentar 24 h. *(elimina carbonatos, evita degradación biológica).*

sifoneo de sln. HCl, lavado exhaustivo con H<sub>2</sub>O destilada hasta un pH≈7. asentamiento 24 h, sifoneo del sobrenadante. liofilización de sedimento *(neutralización del sedimento)*

en bolsa con atm N<sub>2</sub>: sln de extracción\* (previo burbujeo con N<sub>2</sub>)+sedimento [10:1 p/v], agitar 24 h, asentamiento 24 h. *(eliminación de O<sub>2</sub>, extracción de MH-sedimentario)* \* NaOH 0.1M, NaOH 0.5M

solución AH-Na/AF-Na sifoneada a vaso, burbujeada con N<sub>2</sub>, centrifugada a 10,000 rpm/10 min. *(elimina O<sub>2</sub>, separación: sedimento - sln AH-Na/AF-Na, elimina una fracción inorgánica)*

sln AH-Na/AF-Na decantada a vaso, burbujeada con N<sub>2</sub>, agitación y aplicación de HCl 12M (en gotas) hasta pH≈1-2. *(eliminación de O<sub>2</sub>, coagulación del AH-Na)*

suspensión AH-Na/AF-Na centrifugada a 10,000 rpm/10 min. *(precipitación del AH-Na).*

precipitado : AH-Na

solución : AF-Na

[ preparar solución de HCl 0.1M/HF 0.3M ]. AH-Na extraído de los tubos con la solución de HCl/HF y a un vaso, agitación 24 h. *(elimina una fracción inorgánica, inicio de formación del AH-H)*

Columna con Dowex 50W-X8. AF-Na eluido en columna (flujo→goteo), efluente recibido en kitasato. *(elimina una fracción de MO-lábil y una fracción inorgánica por cromatog. de intercambio catiónico).*

[ filtros de nitrato de celulosa de 0.45 μm (lavado exhaustivo con H<sub>2</sub>O desionizada)]. AH-Na/AH-H al sistema de filtración y sobre 0.45 μm, se lava con HCl/HF nuevo, se lleva a vaso, agregar HCl/HF, agitar 24 h, se regresa al sistema de filtración (realizar este ciclo 4 veces). *(termina formación de AH-H, elimina una fracción inorgánica)*

sln del kitasato en liofilizador y preconcentración, descongelado, con ayuda de H<sub>2</sub>O desionizada a vaso chico, liofilizado, registro del peso. *(obtención y cantidad total del AF-H recuperado).*

AH-H después del 4<sup>to</sup> ciclo HCl/HF, lavado exhaustivo con H<sub>2</sub>O desionizada y a vaso chico, liofilizado, registro del peso. *(obtención y cantidad de AH-H recuperado)*

los siguientes recuadros para AH-H y AF-H (por separado).

AH-H (AF-H) en desecador, al vacío, en oscuridad. *(se preserva de humedad, se evita degradación)*

Fracción para espectroscopía IR *(determina las características composicionales).*

Fracción para el % ceniza. *[determinación del grado de pureza de AH-H (AF-H) obtenidos]*

Tabla AH-1: AH-Na Extraído por M-IIO

Cantidad de AH-Na Extraído (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	301.4	308.1	408.9
2	252.2	289.3	402.0
3	232.1	272.8	410.7
4	312.8	314.4	415.7
5	274.6	299.7	402.5
6	276.0	267.6	407.1
7	291.2	301.5	421.0
8	313.8	305.6	425.8
9	303.2	302.4	413.7
10	309.6	326.9	417.2
11	296.0	309.3	414.8
12	237.6	306.6	398.1
13	253.6	279.9	400.7
14	274.9	314.3	407.2
15	314.9	279.8	411.9
16	310.7	292.5	416.1
17	303.6	308.1	405.3
18	223.0	313.4	414.1
19	287.9	315.1	422.2
20	289.3	313.8	425.7
<b>Prom:</b>	<b>282.9 ± 29.1</b>	<b>301.1 ± 15.9</b>	<b>412.0 ± 8.1</b>

Tabla AH-2: Purificación de AH-Na en 0.45 µm por M-IIO

AH-Na : Ceniza Retenida en 0.45 µm (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	2.7	2.7	3.4
2	2.6	3.0	3.7
3	3.0	2.4	3.3
4	2.0	2.6	3.5
5	3.1	3.0	3.6
6	1.8	2.8	3.7
7	2.5	2.7	3.2
8	3.2	2.4	3.7
9	3.4	3.1	3.5
10	1.8	3.0	3.4
11	2.6	2.5	3.5
12	2.5	2.6	3.8
13	2.4	2.7	3.3
14	3.0	2.7	3.8
15	3.3	3.1	3.2
16	2.0	3.0	3.6
17	2.8	2.6	3.4
18	2.3	3.3	3.4
19	3.2	2.5	3.3
20	2.6	2.3	3.8
<b>Prom:</b>	<b>2.6 ± 0.5</b>	<b>2.8 ± 0.3</b>	<b>3.5 ± 0.2</b>

Tabla AH-3: Purificación de AH-Na en 0.20 µm por M-IIO

AH-Na : Ceniza Retenida en 0.20 µm (mg)			
Método IIO			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	4.4	3.7	4.5
2	3.3	4.3	4.7
3	4.0	4.7	4.3
4	2.7	4.2	4.6
5	3.9	3.5	4.8
6	3.5	3.6	4.9
7	3.3	3.7	5.3
8	4.0	3.4	4.2
9	2.8	3.4	4.5
10	4.0	4.3	4.9
11	3.3	4.7	5.0
12	4.3	3.6	4.8
13	3.0	4.0	4.3
14	3.5	4.4	4.6
15	4.0	4.1	5.1
16	3.8	3.8	4.5
17	3.3	3.8	4.8
18	4.7	3.5	4.4
19	3.4	3.8	4.5
20	4.0	3.7	4.6
<b>Prom:</b>	<b>3.7 ± 0.5</b>	<b>3.9 ± 0.4</b>	<b>4.7 ± 0.3</b>

Tabla AH-4: AH-H Recuperado por M-IIO y M-SCH

Cantidad de AH-H Recuperado (mg)					
No. Réplica	Método IIO			Método SCH	
	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M
1	293.2	300.8	399.2	254.1	263.7
2	245.4	281.1	392.2	250.2	267.0
3	224.0	264.5	401.4	243.8	244.6
4	306.7	306.5	406.3	256.2	276.5
5	266.8	292.2	392.8	244.0	260.6
6	269.9	259.8	396.7	258.3	256.1
7	284.2	294.3	410.9	246.7	272.3
8	305.6	298.9	416.6	242.7	276.3
9	296.0	295.0	404.0	255.0	267.4
10	303.0	318.4	407.5	246.9	268.3
11	288.8	301.1	404.9	241.8	260.7
12	229.5	299.0	388.1	247.3	262.0
13	246.9	272.0	391.8	246.7	267.6
14	267.3	306.3	397.0	257.1	
15	306.3	271.6	402.0		
16	304.0	284.9	406.7		
17	296.8	300.5	395.5		
18	214.6	305.7	404.9		
19	280.1	307.7	412.8		
20	281.6	306.7	415.5		
<b>Prom:</b>	<b>275.5 ± 29.3</b>	<b>293.4 ± 16.0</b>	<b>402.3 ± 8.2</b>	<b>249.3 ± 5.7</b>	<b>264.9 ± 8.6</b>

**Tabla AH-5: Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y M-SCH**

Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos (% Ceniza)					
No. Réplica	Método IIO			Método SCH	
	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M
1	0.7	1.6	1.2	2.1	3.2
2	0.3	1.0	1.4	2.1	3.1
3	0.6	1.6	1.5	1.9	3.1
4	0.5	0.9	1.4	1.8	3.2
5	0.6	1.0	1.4	2.1	3.3
6	0.6	1.0	1.4	2.0	3.2
7	0.3	1.3	1.6	2.0	3.2
8	0.3	1.3	1.3	1.8	3.3
9	0.3	1.3	1.6	2.1	3.2
10	0.3	1.2	1.5	2.1	3.3
11	0.5	1.1	1.5	2.2	3.3
12	0.6	1.2	1.5	2.2	3.1
13	0.6	1.3	1.4	2.0	3.2
14	0.4	1.3	1.3	1.9	
15	0.5	1.4	1.4		
16	0.4	1.3	1.6		
17	0.6	1.3	1.5		
18	0.6	1.4	1.4		
19	0.5	1.4	1.2		
20	0.4	1.6	1.2		
<b>Prom:</b>	<b>0.5 ± 0.1</b>	<b>1.3 ± 0.2</b>	<b>1.4 ± 0.1</b>	<b>2.0 ± 0.1</b>	<b>3.2 ± 0.1</b>

Tabla AH-6: Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía.

Fracción Inorgánica de Extractos Húmicos Obtenidos por Diferentes Metodologías																			
M E T	K **	HyO ** **	OdeS **	PyF **	NyK *	M *	PyM ***	IHSS *	MF *	SCH *	SCH **	IIO *	IIO **	IIO ***	P **	P ** **	P -1	P -2	P -3
1	2.1	1.6	0.4	12.2	12.0	1.0	3.4	1.0	5.4	1.9	0.9	1.6	0.7	1.2	1.0	1.0	3.4	2.5	1.1
2	12.1	0.7	0.7		11.3	1.2	1.9	0.1	5.8	0.7	0.9	1.0	0.3	1.4					
3	6.0		5.5		2.0	0.2	4.3	3.4	3.5	1.2	1.0	1.6	0.6	1.5					
4	5.0		3.0		2.0	0.4		0.0		0.7	2.1	0.9	0.5	1.4					
5	8.3		0.5		2.4			0.8		1.0	1.0	1.0	0.6	1.4					
6	4.1				12.6			2.2		0.9	1.3	1.0	0.6	1.4					
7	2.9				7.9			0.9			0.7	1.3	0.3	1.6					
8	2.1				3.8			0.9			0.9	1.3	0.3	1.3					
9	5.5							1.7				1.3	0.3	1.6					
10	5.3							1.1				1.2	0.3	1.5					
11	4.3							5.1				1.1	0.5	1.5					
12	6.0							1.8				1.2	0.6	1.5					
13	5.0							0.5				1.3	0.6	1.4					
14	5.9							0.8				1.3	0.4	1.3					
15	5.0							1.1				1.4	0.5	1.4					
16	8.2											1.3	0.4	1.6					
17	2.1											1.3	0.6	1.5					
18	12.1											1.4	0.6	1.4					
19	5.3											1.4	0.5	1.2					
20	4.3											1.6	0.4	1.2					
21	15.5																		
22	5.0																		
23	6.4																		
24	3.3																		
25	2.1																		
26	6.1																		
27	5.3																		
28	2.7																		
29	2.9																		
30	0.9																		
31	6.6																		
32	4.3																		
33	10.8																		
34	3.9																		
35	8.4																		
36	4.8																		
37	5.9																		
38	4.7																		
39	3.8																		
40	3.2																		
41	5.1																		
42	5.0																		
43	10.2																		
44	5.7																		
45	1.7																		
46	4.2																		
47	3.8																		
48	5.2																		
49	5.9																		
50	5.9																		
51	3.0																		
52	1.7																		
53	4.8																		
54	1.6																		
55	5.5																		
56	6.4																		
57	5.5																		
58	3.7																		
P:	5.2	1.2	2.0	12.2	6.7	0.7	3.2	1.4	4.9	1.1	1.1	1.3	0.5	1.4	1.0	1.0	3.4	2.5	1.1
±	2.8	0.6	2.2	-	4.7	0.5	1.2	1.3	1.2	0.5	0.4	0.2	0.1	0.1	-	-	-	-	-

Referencias de datos:

- [M-K]: .....King (1967); Rashid y King (1969, 1970, 1971); Rashid (1971)
- [M-HyO]: .....Hori y Okuda (1961)
- [M-OdeS]: .....Ortiz de Serra y Schnitzer (1973)
- [M-PyF]: .....Picard y Felbeck (1976)
- [M-NyK]: .....Nissenbaum y Swaine (1976)
- [M-M]: .....Malcolm (1976)
- [M-PyM]: .....Poutanen y Morris (1983)
- [M-IHSS]: .....Calderoni y Schnitzer (1984); Senesi *et al.*, (1989); Reid *et al.*, (1990);  
Wershaw y Pinckney (1990)
- [M-M.F]: .....Gonzalez-Vila *et al.*, (1992)
- [M-SCH]: .....Chen y Schnitzer (1976); Ghosh y Schnitzer (1980); Tan *et al.*, (1992);  
Lobartini *et al.*, (1991, 1992)
- [M-P]: .....Piccolo (1988)

Simbología de las Soluciones de Extracción:

- \* .....NaOH 0.1M
- \*\* .....NaOH 0.5M
- \*\*\* .....NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M
- \*\*\*\* .....Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M
- 1 .....Acetona
- 2 .....DMSO
- 3 .....DMF

Tabla AF-1: AF-Na Extraído por M-IIO

Cantidad de AF-H Extraído (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	109.7	100.2	159.4
2	127.2	84.8	176.4
3	126.4	93.3	162.6
4	114.8	100.6	166.2
5	130.5	98.9	171.9
6	121.1	92.8	171.2
7	111.2	96.9	156.8
8	108.3	96.3	160.0
9	118.0	99.1	148.1
10	123.1	106.1	172.2
11	108.5	93.6	163.9
12	116.3	103.7	171.0
13	116.3	93.8	156.6
14	123.3	104.0	151.9
15	125.3	101.1	155.8
16	119.5	88.4	157.3
17	120.1	91.9	150.8
18	111.2	103.0	153.5
19	122.5	105.3	150.2
20	128.9	102.9	146.4
<b>Prom:</b>	<b>119.1 ± 6.9</b>	<b>97.8 ± 5.9</b>	<b>160.1 ± 9.0</b>

Tabla AF-2: Purificación de AF-Na en 0.45 µm por M-IIO

AF-Na : Ceniza Retenida en 0.45 µm (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	3.3	3.6	4.1
2	3.7	3.4	4.0
3	2.9	3.2	4.2
4	2.9	3.7	4.3
5	3.8	3.8	4.0
6	2.8	3.1	4.5
7	2.7	3.7	4.2
8	3.2	3.2	4.2
9	4.0	3.6	4.4
10	3.5	3.4	3.9
11	2.9	4.2	4.5
12	3.4	3.2	4.4
13	2.7	2.9	4.0
14	4.1	3.2	4.2
15	3.4	3.4	4.2
16	3.6	2.8	4.3
17	3.5	3.4	4.2
18	3.8	2.9	4.4
19	3.6	3.3	4.5
20	2.9	3.2	3.9
<b>Prom:</b>	<b>3.3 ± 0.4</b>	<b>3.3 ± 0.3</b>	<b>4.2 ± 0.2</b>

Tabla AF-3: Purificación de AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -básico por M-IIO

AF-Na : Ceniza Retenida en 0.20 $\mu\text{m}$ -básico (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	4.2	4.4	5.4
2	4.3	4.1	5.2
3	4.6	4.8	5.3
4	4.7	4.4	5.6
5	4.5	5.4	5.8
6	4.8	4.2	5.3
7	4.4	4.8	5.7
8	5.1	4.2	5.9
9	4.7	4.8	5.0
10	4.8	4.6	5.8
11	5.2	4.8	5.7
12	4.9	5.0	5.7
13	4.9	5.7	5.0
14	4.4	4.8	5.4
15	5.1	5.0	5.3
16	5.0	4.2	5.4
17	4.8	5.0	5.7
18	4.6	5.1	5.3
19	4.7	4.8	5.7
20	4.4	4.2	5.8
<b>Prom:</b>	<b>4.7 ± 0.3</b>	<b>4.7 ± 0.4</b>	<b>5.5 ± 0.3</b>

Tabla AF-4: Purificación de AF-Na en 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido por M-IIO

AF-Na : Ceniza Retenida en 0.20-ácido $\mu\text{m}$ (mg)			
<i>Método IIO</i>			
No. Réplica	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M
1	5.4	5.5	6.2
2	5.2	4.7	5.8
3	5.5	6.7	5.6
4	6.2	5.4	5.8
5	5.7	4.8	5.4
6	5.8	5.7	5.5
7	5.0	5.6	6.1
8	5.4	5.0	5.4
9	5.7	5.6	6.2
10	6.2	6.5	5.5
11	6.0	5.6	5.8
12	6.2	5.9	6.4
13	5.2	5.3	5.8
14	5.8	5.8	5.7
15	6.1	5.8	6.3
16	5.8	6.7	6.3
17	5.1	6.2	5.5
18	5.6	5.2	6.2
19	4.9	6.8	6.1
20	6.2	5.9	5.6
<b>Prom:</b>	<b>5.6 ± 0.4</b>	<b>5.7 ± 0.6</b>	<b>5.9 ± 0.3</b>

Tabla AF-5: AF-H Recuperado por M-IIO y M-SCH

Cantidad de AF-H Recuperado (mg)					
No. Réplica	Método IIO			Método SCH	
	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M
1	91.2	81.8	137.6	85.1	114.8
2	109.3	66.8	156.3	81.5	119.9
3	108.2	72.3	141.4	96.4	118.8
4	96.8	81.6	144.3	101.6	111.2
5	111.5	80.0	151.3	84.1	114.5
6	102.4	74.0	150.3	86.9	125.1
7	93.9	77.1	134.2	91.5	120.8
8	90.0	78.6	138.5	81.8	117.9
9	99.0	80.3	126.6	86.6	113.6
10	103.3	86.4	151.0	99.6	115.5
11	88.6	74.2	142.3	99.1	116.8
12	96.6	84.2	148.6	105.7	126.7
13	98.6	75.1	136.0	101.8	113.3
14	104.5	84.7	130.4	91.8	
15	105.5	81.0	134.2		
16	100.4	69.9	135.6		
17	101.8	72.5	130.0		
18	92.2	84.1	131.6		
19	104.7	85.5	127.4		
20	110.6	84.6	125.2		
<b>Prom:</b>	<b>100.5 ± 7.0</b>	<b>78.7 ± 5.7</b>	<b>138.6 ± 9.2</b>	<b>92.4 ± 8.2</b>	<b>117.6 ± 4.6</b>

Tabla AF-6: Fracción Inorgánica del Extracto Fúlvico por M-IIO y M-SCH

Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos (% Ceniza)					
No. Réplica	Método IIO			Método SCH	
	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M	NaOH 0.1M / Na <sub>4</sub> P <sub>2</sub> O <sub>7</sub> 0.1M	NaOH 0.5M	NaOH 0.1M
1	3.0	2.8	4.7	4.2	4.4
2	2.6	3.7	4.2	4.5	4.0
3	2.9	3.2	5.1	4.6	4.2
4	3.0	4.0	4.4	4.2	4.2
5	3.1	4.5	4.5	4.1	4.2
6	2.6	3.9	4.1	4.8	4.4
7	3.0	2.9	4.2	4.5	4.4
8	2.4	3.8	4.3	4.3	4.3
9	2.4	4.4	4.2	4.4	4.2
10	2.7	4.6	5.2	4.4	4.5
11	2.4	2.9	-	4.2	4.4
12	2.4	3.1	4.2	4.5	4.5
13	2.4	4.4	4.1	4.6	4.3
14	2.5	3.8	4.2	4.3	
15	3.0	3.7	4.2		
16	2.8	4.2	5.0		
17	2.9	4.1	4.1		
18	2.7	4.0	4.1		
19	3.1	3.7	4.1		
20	3.1	3.2	4.1		
<b>Prom:</b>	<b>2.8 ± 0.3</b>	<b>3.8 ± 0.6</b>	<b>4.4 ± 0.4</b>	<b>4.4 ± 0.2</b>	<b>4.3 ± 0.1</b>

Tabla AF-7: *Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos por M-IIO y otras Metodologías de la Bibliografía.*

Fracción Inorgánica de Extractos Fúlvicos Obtenidos por Diferentes Metodologías												
Método:	K **	OdeS **	NyK *	M *	II **	PyM ***	IHSS *	SCH *	SCH **	IIO *	IIO **	IIO ***
1	9.5	12.9	8.3	15.0	1.0	3.6	0.8	4.3	1.0	2.8	3.0	4.7
2	7.1	5.7		2.3	2.6	4.5	3.5	8.1	2.4	3.7	2.6	4.2
3	10.6	8.6		1.9	2.7	7.1		1.6	1.1	3.2	2.9	5.1
4	12.5			1.7	1.0			1.0	1.5	4.0	3.0	4.4
5	10.7			1.9	2.8			1.3	2.6	4.5	3.1	4.5
6	14.9				1.8				2.0	3.9	2.6	4.1
7	12.7				1.0				1.5	2.9	3.0	4.2
8	10.5				1.5				1.0	3.8	2.4	4.3
9	7.0				2.1					4.4	2.4	4.2
10	12.8									4.6	2.7	5.2
11	11.5									2.9	2.4	-
12	13.0									3.1	2.4	4.2
13	4.5									4.4	2.4	4.1
14	9.4									3.8	2.5	4.2
15										3.7	3.0	4.2
16										4.2	2.8	5.0
17										4.1	2.9	4.1
18										4.0	2.7	4.1
19										3.7	3.1	4.1
20										3.2	3.1	4.1
Prom:	10.5	9.1	8.3	4.6	1.8	5.1	2.2	3.3	1.6	3.8	2.8	4.4
±	2.8	3.7	-	5.8	0.8	1.8	1.9	3.0	0.6	0.6	0.3	0.4

Referencias de datos:

[M-K]: .....King (1967); Rashid y King (1969, 1970)

[M-OdeS]: .....Ortiz de Serra y Schnitzer (1973)

[M-NyK]: .....Nissenbaum y Swaine (1976)

[M-M]: .....Malcolm (1976); Aiken *et al.*, (1979)

[M-H]: .....Holtzclaw *et al.*, (1976)

[M-PyM]: .....Poutanen y Morris (1983)

[M-IHSS]: .....Senesi *et al.*, (1989)

[M-SCH]: .....Chen y Schnitzer (1976); Ghosh y Schnitzer (1980); Tan *et al.*, (1992); Lobartini *et al.*, (1991, 1992)

Simbología de las Soluciones de Extracción:

\* .....NaOH 0.1M

\*\* .....NaOH 0.5M

\*\*\* .....NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M

**ESQUEMA DE LAS CARACTERISTICAS DE LOS METODOS QUE EXTRAEN MH-SEDIMENTARIO:**

Método	Tipo MH	Secado Sedim.	Limp. Org.	Sedim. pH ≈ 7	Atn N <sub>2</sub>	Slu. Extracc.	Tratamientos de Purificación Aplicados							Pre-conc.	Liof. MH	
							Centrifugación	Filtración	Ciclos A↔B	Congelar → Descongelar	HCl/HF	Diálisis	Cromatografía			
													Adsorción			Catiónica
HyO	AH	Amb.				3	•									•
PyF	AH	100°C				2	•									•
P	AH	Amb.				2, 3, 5	•									•
M.F	AH	?	•	?	?	1	?	?	?	?	?	?	?	?	?	?
K	AH/AF	Amb.			•	2	•									•
OdeS	AH/AF	Amb.			•	2	•									•
NyK	AH/AF	Liofil.			•	1	•									•
M	AH/AF	Liofil.			•	1	•									•
PyM	AH/AF	Amb.			•	4	•									•
IHSS	AH/AF	Liofil.		•	•	1	•									•
SCH	AH/AF	Liofil.			•	1, 2	•									•
IIO	AH/AF	Liofil.		•	•	1, 2, 4	•									•
H	AF	Liofil.			•	2	•									•

<sup>1</sup> NaOH 0.1M, <sup>2</sup> NaOH 0.5M, <sup>3</sup> Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M, <sup>4</sup> NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M, <sup>5</sup> Soluciones Orgánicas (DMSO; N,N,-DMF; Acetona)

## **MARCO TEORICO CONCEPTUAL DEL M-IIO:**

### **Liofilización del Sedimento:**

En las metodologías que extraen MH de suelos y sedimentos, la temperatura de secado de los mismos ha sido muy variable. En el método **M-PyF** (Picard y Felbeck, 1976) el secado se realizó a 100°C. En las metodologías **M-HyO** (Hori y Okuda, 1961); **M-P** (Piccolo, 1988); **M-K** (King, 1967; Rashid y King, 1969, 1970, 1971; Rashid, 1971); **M-OdeS** (Ortiz de Serra y Schnitzer, 1973); y **M-PyM** (Poutanen y Morris, 1983) el secado fue verificado a temperatura ambiente ( $\approx 25^{\circ}\text{C}$ ). Finalmente, en los métodos **M-NyK** (Nissenbaum y Kaplan, 1972; Nissenbaum y Swaine, 1976); **M-M** (Malcolm, 1976; Aiken *et al.*, 1979); **M-H** (Holtzclaw *et al.*, 1976); **M-SCH** (Chen y Schnitzer, 1976; Ghosh y Schnitzer, 1980; Tan *et al.*, 1992; Lobartini *et al.*, 1991, 1992); y **M-IHSS** (Calderoni y Schnitzer, 1984; Senesi *et al.*, 1989; Reid *et al.*, 1990; Wershaw *et al.*, 1990) el suelo o sedimento fue liofilizado. El inconveniente de no secar a muy bajas temperaturas es una persistencia en la actividad microbiana, misma que provoca cambios fisico-químicos por oxidación, hidrólisis, y desnaturalización de la MO (Malcolm, 1968). A pesar de su carácter altamente refractario, el MH no está exento a modificaciones mediadas microbiallymente. En la liofilización el secado se realiza a muy baja temperatura y bajo una condición de vacío; por lo cual el secado es más completo y se minimiza la actividad microbiana (Malcolm, 1968). Dado lo anterior, el **M-IIO** realiza el liofilizado a  $\approx -55^{\circ}\text{C}$ ; tal técnica se aplica en el sedimento previo a la extracción de MH, en pasos intermedios del **M-IIO**, y en los extractos fúlvicos y húmicos finales.

### **Limpieza Acida Previa del Sedimento:**

En los métodos estudiados se observó que un tratamiento-ácido previo a la extracción de MH, se realizó solamente cuando se presumía la presencia de carbonatos en la muestra. Sin embargo Aiken (1985) y Pignalosa *et al.*, (1991) indican que un tratamiento con HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluidos (pH:1-2) debe realizarse en cualquier muestra para destruir bacterias (*e.g.*, *Pseudomonas spp.*) que actúan sobre las porciones fenólicas del MH, coadyuvando a su degradación biológica. En base a esto, el **M-IIO** realiza tal acidificación independientemente del contenido o ausencia de carbonatos en el sedimento.

### Problemática en la Influencia Lumínica:

De las metodologías estudiadas, ninguna contempló ni hizo referencia al efecto que pudiese tener la luz en el MH. Al respecto, Kieber *et al.* (1990) realizaron experimentos tendientes a conocer posibles efectos de la luz solar sobre este material. Sus resultados indicaron que la región UV-B (280-320 nm) fue responsable de la degradación parcial del MH, con la subsecuente fotoproducción de compuestos carbonilos de bajos pesos moleculares (*e.g.*, formaldehído, acetaldehído, y ácido glyoxilato  $\alpha$ -ceto). Asimismo Aiken (1985) recomienda preservar al MH en la oscuridad, pues de lo contrario podría oxidarse químicamente si se verifican reacciones fotoquímicas. En base a esto, en el **M-IIO** se minimiza la cantidad de luz incidente a partir de la aplicación de la solución extractora.

### Atmósfera Inerte:

De los métodos estudiados, los que utilizan una atmósfera inerte al momento de extraer MH son: **M-K**, **M-OdeS**, **M-NyK**, **M-M**, **M-PyM**, **M-SCH**, y **M-IHSS**. Para Haddad *et al.* (1990) y Jakobsen (1992) una atmósfera inerte al extraer con soluciones de pH básico, disminuye las reacciones de autooxidación de la MO. Para estudiar tal hecho, Tan *et al.* (1991 y 1992) investigaron sobre posibles diferencias entre MH extraído al aire (MH-aire) y bajo atmósfera inerte (MH-N<sub>2</sub>). En ambos trabajos y para las dos condiciones mencionadas, se midió y/o comparó: cantidad de MH extraído; contenido elemental en C, H, O, N, y S; espectroscopía IR y NMR-<sup>13</sup>C; y acidez total (grupos carboxilos + grupos hidroxifenólicos). Los resultados indicaron que las únicas diferencias significativas fueron en la acidez total, donde el MH-N<sub>2</sub> exhibió valores notablemente mayores. Los autores concluyen que este resultado no confirma la idea de mayor oxidación del MH-aire; aún cuando la oxidación de carbono-orgánico en C-OH y COOH deba ocurrir más rápidamente en condiciones airadas. Probablemente, el empobrecimiento en grupos funcionales del MH-aire se deba a la verificación de reacciones de condensación en el mismo. Con lo cual, el MH-N<sub>2</sub> reflejaría más la acidez total del MH-natural. En el **M-IIO** se utiliza una atmósfera de N<sub>2</sub> durante la extracción, y en los pasos donde las soluciones fúlvicas y húmicas se encuentran a pH básico; para así disminuir su razón de oxidación química.

### Soluciones de Extracción:

Las soluciones utilizadas para extraer MH de suelos y sedimentos varían en su naturaleza y/o en su concentración. Por un lado se ha recurrido a mezclas orgánicas-inorgánicas de H<sub>2</sub>O-HCl-solventes apróticos dipolares [dimetilsulfóxido (DMSO); N,N-dimetilformamido (DMF); y acetona (Hayes *et al.*, 1975; Piccolo, 1988); o sulfolano (Hayes, 1985)]. Por otra parte se han usado soluciones exclusivamente inorgánicas. La utilización de NaOH 0.1M ha sido reportada por Tschapek y Wasowski (1976), Frizado (1979), Lobartini *et al.*, (1991), Tan *et al.*, (1992), y Gonzalez-Vila *et al.*, (1992). Solución de NaOH 0.5M se registra en los trabajos de Shon y Hughes (1981), Hatcher *et al.*, (1983), Francois (1987), Ghosh y Schnitzer (1980), Piccolo (1988), y Lobartini *et al.*, (1992). Otros han preferido el Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (Hori y Okuda, 1961; Kononova, 1982; Piccolo, 1988; 1992), o una solución compuesta de NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (Cronin y Morris, 1982; Hayase y Tsubota, 1983; Wenda *et al.*, 1987). En menor medida se ha optado por NH<sub>4</sub>OH 0.5M (Baker, 1986).

El uso de mezclas de H<sub>2</sub>O-HCl-solventes apróticos dipolares, se basa en la creencia de que el alto momento dipolar de los solventes orgánicos favorece la formación de fuertes enlaces de hidrógeno entre el solvente y las moléculas fúlvicas y húmicas (Hayes *et al.*, 1975; Hayes, 1985; Piccolo, 1988). Asimismo, se asume que el HCl 0.6M protona al MH, y el H<sub>2</sub>O promueve una eficiente solvatación del mismo, debido a su alta constante dieléctrica (Piccolo, 1988). En el trabajo de Piccolo (1988) se indica que la extracción con solventes apróticos dipolares es más “suave” que al realizarla con NaOH 0.5M y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M. Además se menciona que los AH obtenidos de los primeros, y sin tratamiento con HCl/HF, presentan menor contaminación inorgánica. Sin embargo este autor encuentra que una vez aplicada la purificación con HCl/HF, los contenidos de ceniza de los AH de NaOH y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> son menores (ambos: 1.0%) que los de DMSO, N,N-DMF, y acetona (2.48%, 1.10%, y 3.40%, respectivamente). Por otra parte, Hayes (1985) indica que el MH extraído con sulfolano se enriquece con azufre; lo cual atribuye a una adsorción del solvente por parte del MH. Finalmente Hayes *et al.*, (1975), Hayes (1985), y Piccolo (1988) mencionan que los solventes apróticos dipolares realizan una extracción selectiva hacia las fracciones de MH que no han desarrollado fuertes enlaces con arcillas; lo cual provoca intervalos “artificiales” en la distribución de pesos moleculares. En contraparte, el MH extraído con NaOH y Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> presenta un mayor intervalo en tal distribución, por lo cual informa más verazmente sobre los diferentes tamaños de las moléculas húmicas y fúlvicas en el medio natural.

En las soluciones de NaOH 0.1M, 0.5M, Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M, y NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M, los aspectos importantes son un pH  $\geq$  9 y la presencia de cationes monovalentes (Na<sup>+</sup>). Por una parte, el pH  $\geq$  9 provoca la disociación de grupos funcionales del MH. Por otro lado, el hecho de que los cationes de las soluciones sean monovalentes, hace que estos sean fácilmente disociados de los grupos funcionales, lo que permite que los sitios aniónicos de las bases conjugadas sean hidratados. Rashid (1985) y Stevenson (1985) no recomiendan el uso de soluciones más concentradas; ya que el MH debe conservar sitios aniónicos que puedan hidratarse (carácter hidrofílico). En caso contrario, la ausencia de sitios aniónicos libres causaría un carácter hidrofóbico, y el agua de la solución hidrataría más bien al exceso de iones Na<sup>+</sup> presentes (Tschapek y Wasowski, 1976).

En relación a las soluciones constituidas exclusivamente de NaOH, Schnitzer (1982) y Aiken (1985) mencionan que el NaOH 0.1M extrae más MH que la solución de 0.5M; de cualquier manera esta última extrae MH con menos ceniza. Sin embargo una desventaja de extraer con estas soluciones, es que si la naturaleza de los cationes polivalentes asociados al MH son principalmente Fe (III) y/o Al (III), entonces el Na de la solución no podrá desplazarlos o el reemplazamiento sería tan limitado que la extracción sería mínima. Esto se debe a que los cationes trivalentes forman fuertes complejos de coordinación con el MH. En caso de que el catión polivalente más asociado sea el Ca (II) la extracción sería mayor; ya que este no forma complejos de coordinación muy fuertes (Hopner y Orliczek, 1978; Stevenson, 1985; Snoeyink y Jenkins, 1990).

En la solución de NaOH 0.1M / Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 0.1M (N/N), el pirofosfato se manifiesta como un fuerte agente quelante, por lo cual forma complejos de coordinación más estables con el Fe (III) y Al (III), que los que forman estos con el MH. Tal hecho permite que el MH se separe de estos cationes y se disuelva en la solución (Kononova, 1982; Stevenson, 1985). Los iones Na<sup>+</sup> del NaOH y del Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub> realizan un intercambio catiónico por los di-, -trivalentes enlazados al MH, siendo los productos principales unos quelatos de Na consistentes de sales solubles de AF-Na y AH-Na, mismas que son fácilmente disociables y por tanto hidratadas en sus bases conjugadas (Kononova, 1982; Stevenson, 1985; Wenda *et al.*, 1987). Con el uso de N/N se obtiene una mayor extracción de MH de suelos y sedimentos (Kononova, 1982; Stevenson, 1985; Calvert *et al.*, 1985; Wenda *et al.*, 1987; Fengler *et al.*, 1989). De acuerdo a Wenda *et al.*, (1987) esta solución extrae hasta diez veces más AH y dos veces más AF que el NaOH 0.5M.

La utilización de NH<sub>4</sub>OH se limita a pocos trabajos que incluyen al de Baker (1986). Sin embargo Stevenson y Schnitzer (1982), Hatcher *et al.*, (1983), y Aiken (1985) no recomiendan su

uso. Estos autores mencionan que el ion amonio ( $\text{NH}_4^+$ ) puede interactuar fuertemente con el MH y su eliminación del extracto final ser difícil, coadyuvando a elevar “artificialmente” el contenido de nitrógeno en el material aislado.

Dadas las ventajas y desventajas de los diferentes solventes, en el **M-IIO** se decidió aplicar las soluciones: NaOH 0.1M, 0.5M, y N/N. Posteriormente para las tres soluciones, se determinó si existían diferencias estadísticamente significativas en cuanto a capacidad de extracción, incorporación de Cl, cantidad de MH recuperado, pureza y alteración composicional de los extractos obtenidos.

### Centrifugación:

La centrifugación es una técnica muy utilizada para remover partículas, por lo cual todas las metodologías estudiadas recurrieron a ella, aunque sin embargo no coincidieron con la velocidad y tiempo del centrifugado. Ejemplos: 15,000 rpm/20 min (Holtzclaw *et al.*, 1976), 10,000 rpm/10 min (Schnitzer, 1982), 8,000 rpm/60 min (Hayase y Tsubota, 1983), 3,000 rpm/45 min (Baker, 1986), y 15,000 rpm/15 min (Tan *et al.*, 1991 y 1992). En particular Holtzclaw *et al.*, (1976) mencionan que una velocidad  $\gg$  15,000 rpm o un tiempo  $\gg$  20 min. pueden provocar una destrucción parcial del AF. En base a estas discrepancias, en el **M-IIO** se realizaron pruebas tendientes a precipitar lo mejor posible el soluto, aunado a un menor tiempo de centrifugado. Los resultados indicaron que una combinación óptima se constituyó a 17,500 rpm/10 min.

### Filtración:

En contraparte a la centrifugación, la técnica de filtración no a sido imprescindible para purificar al MH. Así, solo cinco metodologías estudiadas recurrieron a la misma. Aún cuando el común denominador fue la filtración de soluciones con pH básico, la composición y nomio de los filtros o la técnica de filtración en sí, fueron diferentes en todos los métodos. En el **M-HyO** no se especifica la composición ni el nomio de los filtros. En el **M-P** y el **M-H** se utilizan filtros de fibra de vidrio, pero no se aclara el tamaño nominal. En el **M-M** se recurre a filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ . En la **M-PyM** se verifican tres tipos de filtración, la primera con filtros de fibra de vidrio GF/C y GF/F; la segunda a través de membranas de ultrafiltración Diaflo XM-300, XM-100, PM-30, y PM-10; y la tercera utilizando una celda de ultrafiltración Amicon modelo 2000 A.

Malcolm (1976) consideró conveniente filtrar el MH a través de filtros de membrana de 0.45  $\mu\text{m}$ , ya que Sholkovitz (1976) indica que este nomio separa operacionalmente al material disuelto del particulado. No obstante, Aiken (1985) menciona que el tamaño de los coloides-arcillosos va de 0.001  $\mu\text{m}$  a 1.0  $\mu\text{m}$ , con lo cual los filtros de 0.45  $\mu\text{m}$  no liberan las soluciones fúlvicas y húmicas de coloides-arcillosos menores de este nomio. En la investigación realizada por Aiken (1985) se estudió la relación entre el MH y filtros de diferente composición (fibra de vidrio, nitrato de celulosa, y plata). Este autor indicó que el filtro de fibra de vidrio tiene la desventaja de no poseer un tamaño de poro uniforme, por lo cual deja pasar a través de él hasta un 10% de CI mayores al tamaño nominal. Por su parte, el filtro de nitrato de celulosa exhibe un tamaño de poro más uniforme que el anterior, pero presenta MO-lábil que puede contaminar las soluciones de MH, además de retener hasta un 5% del mismo. Aún así, el problema de la MO-lábil puede superarse si el filtro se lava exhaustivamente con agua desionizada. Aiken (1985) cataloga al filtro de plata como el más ventajoso, ya que además de presentar un tamaño de poro uniforme, muestra propiedades bactericidas que ayudan a disminuir una posible descomposición biológica del MH. Asimismo, este autor estima que el filtro de plata retiene MH hasta en un 3 %.

El M-IIO utiliza filtros de nitrato de celulosa, y contempla dos filtraciones para el AH-Na y tres para el AF-Na. Para ambos materiales se realizan filtraciones a 0.45  $\mu\text{m}$  y 0.20  $\mu\text{m}$  (ambas a  $\text{pH} \approx 13-14$ ). Sin embargo el AF-Na verifica una nueva filtración a 0.20  $\mu\text{m}$  y con  $\text{pH} \approx 3-4$ . Las filtraciones a  $\text{pH} \approx 13-14$  se deben a que en esta condición hay una mínima asociación: minerales de arcilla  $\leftrightarrow$  MH. Lo cual es debido a la repulsión de cargas negativas que experimentan entre sí el MH y los hidróxidos metálicos. En condiciones muy básicas se producen cargas negativas en las superficies de estos últimos (los H de los -OH están disociados), con lo cual no forman puentes de enlace entre el MH y los minerales de arcilla. Si se empezase a disminuir el pH, se llegaría a un punto denominado "punto de cero carga", en el cual se reabsorbería la cantidad de H necesaria para formar todos los OH, resultando con esto una superficie sin carga neta. Finalmente si se llevase la solución hasta un  $\text{pH} \approx 1-2$ , los hidróxidos metálicos absorberían  $\text{H}^+$  de la solución quedando cargados positivamente; consecuentemente se incrementaría la cantidad de puentes de enlace que darían lugar a una gran asociación organo-arcillosa (Rashid, 1985). Debido a esto, en las filtraciones muy básicas debe retenerse una fracción de minerales de arcilla con una mínima asociación al MH. Por otra parte, a pesar de la mayor asociación organo-arcillosa en pH ácido, se verificó una filtración a  $\text{pH} \approx 3-4$  en el AF-Na, misma que es posterior a la filtración 0.20  $\mu\text{m}$ -básica. Esta filtración ácida se realiza porque en esta condición los minerales de arcilla expandibles

(*e.g.* monmorillonitas, smectitas, vermiculitas) aumentan su volumen al incrementar su espacio interlaminar; algo que no sucede en medio básico (Rashid, 1985). Debido a esto se pensó que algunos minerales de arcilla no-retenidos en las filtraciones anteriores se retuvieran en 0.20  $\mu\text{m}$ -ácido. Hay que aclarar que esta filtración puede provocar retenciones (pérdidas) de AF-Na.

### Ciclos Acido-Base:

Un tratamiento para liberar al AH-Na de impurezas metálicas consiste en realizar varios ciclos continuos ácido  $\leftrightarrow$  base. En el **M-IIO**, un ciclo ácido  $\leftrightarrow$  base consiste en tener la solución húmica a  $\text{pH} \approx 13-14 \rightarrow$  llevarla drásticamente a  $\text{pH} \approx 1-2 / 10 \text{ min.} \rightarrow$  centrifugar a 17,500 rpm / 5 min.  $\rightarrow$  decantar-desechar el sobrenadante. Esta técnica se realiza en seis metodologías estudiadas: **M-HyO**, **M-K**, **M-OdeS**, **M-NyK**, **M-M**, y **M-PyM**. El objetivo de efectuar cambios drásticos y continuos del pH es para remover la fracción metálica enlazada al AH-Na. Cuando la solución húmica se encuentra a  $\text{pH} \geq 9$  se promueve la complejación de metales por la disociación de grupos funcionales. Sin embargo al bajar drásticamente el pH a 1-2, la solución se transforma en una suspensión (coagulación del AH-Na) y se verifica una competencia entre los iones  $\text{H}^+$  añadidos y los metales; resultando en una alta neutralización de grupos funcionales por H, y una liberación de metales a la solución que posteriormente se desecha (Rashid, 1985). Aún así, la remoción metálica es solo parcial, ya que no ocurre cuando los complejos organo-metálicos son muy estables. En el **M-IIO** se aplican cinco ciclos ácido  $\leftrightarrow$  base, considerando que esta cantidad es suficiente para remover los metales que realmente puedan liberarse de las interacciones organo-metálicas.

### Cromatografía de Adsorción:

Las resinas adsorbentes Amberlita XAD están formadas por copolímeros macroporosos no-iónicos constituidos de estireno-divinilbenceno (XAD-1, XAD-2, XAD-4) o ester-acrílico (XAD-7 y XAD-8). Estas se han utilizado para purificar y preconcentrar AF del agua (Malcolm, 1989 y 1990; Aiken, 1985). En el mecanismo de adsorción, los grupos no-polares del AF (*e.g.*, carbonilos y metilos) son adsorbidos en la fase estacionaria de la columna cromatográfica, mientras los grupos polares (*e.g.*, hidroxilos y carboxilos) se orientan hacia la fase móvil. La adsorción ocurre a  $\text{pH} = 2$ , cuando el AF se encuentra en forma no-iónica (carácter hidrofóbico) (Hatcher *et al.*, 1985). La desadsorción se logra al ionizar los grupos no-polares ( $\text{pH} > 5.5$ ), cuando el AF toma un carácter

hidrofílico y se solubiliza (Hatcher *et al.*, 1983). Thurman (1985) indica que el carácter parcialmente hidrofóbico del AF promueve su purificación cuando pasa a través de resinas XAD. Al eluir la solución fúlvica, una fracción de MO-lábil e hidrofílica (*e.g.*, carbohidratos simples, ácidos urónicos, e hidroxiácidos) eluye de la columna al momento mismo de la adsorción del AF.

Algunas metodologías que extraen AF del agua han usado las resinas Amberlita, observándose una preferencia en los tipos XAD-2 (Cronin y Morris, 1982; Hayase y Tsubota, 1983) y XAD-8 (Hatcher *et al.*, 1983; Thurman *et al.*, 1978; Thurman y Malcolm, 1981; MacCarthy *et al.*, 1979; Malcolm, 1989 y 1990; Aiken *et al.*, 1979). En los trabajos donde se recomienda la XAD-8 se efectuaron estudios sobre el comportamiento del AF en las distintas resinas XAD. Estos mostraron mayor dificultad en desadsorción y una adsorción irreversible en las resinas de estireno-divinilbenceno; lo cual fue atribuido a fuertes interacciones hidrofóbicas y posibles interacciones  $\pi$ - $\pi$  con la matriz aromática de la resina. La eficiencia en las eluciones en las resinas fueron: XAD-1 (70%), XAD-2 (75%), y XAD-4 (70%). Por otra parte, en las resinas más hidrofílicas de ester-acrílico (XAD-7 y XAD-8) la adsorción del AF fue más rápida y la elución se verificó con mayor facilidad y eficacia (98% para ambas resinas). Sin embargo cuando la fase móvil fue NaOH se observaron problemas de sangrado en las columnas con XAD-7, con lo cual la resina XAD-8 fue más recomendada.

De las metodologías estudiadas, solo la M-K recurrió a la cromatografía de adsorción (con alúmina) para purificar el AF extraído. Sin embargo King (1967) y Aiken (1985) hacen referencia a problemas de adsorción irreversible en la alúmina, llegando a recuperarse solo entre el 60-80% del AF original. Además hay formación de complejos organo-alumínicos por la reacción del AF en la superficie de la alúmina, produciéndose alteraciones composicionales del AF eluido. Aún cuando las resinas Amberlita XAD se han empleado para extraer AF del agua, el M-IIO recomienda el uso de Amberlita XAD-8 en la solución de AF-Na.

### Cromatografía de Intercambio Catiónico:

Una técnica de purificación consiste en contactar al MH con resinas de intercambio catiónico (en forma protonada). Esto sirve para que el MH intercambie el Na proveniente de las soluciones de extracción por H de la resina. Tales resinas permiten también la remoción de metales traza y otros cationes que se asociaron al MH desde el mismo sedimento (Aiken, 1985; Thurman y Malcolm, 1983; Thurman, 1985; Malcolm, 1989; Plummer, 1981).

Algunas metodologías que protonan al MH por medio de cromatografía de intercambio catiónico han utilizado las siguientes resinas: Amberlita IR-120 (Yonebayashi y Hattori, 1990; Malcolm, 1976; Schnitzer, 1982); K4-2 y KB-4 (Kononova, 1982); AG-MP-50 (Thurman y Malcolm, 1981); Rixin 101 (King, 1967; Ortiz de Serra y Schnitzer, 1973); AG 50W-X8 (Malcolm, 1989); y finalmente Dowex 50W-X8 (Hatcher *et al.*, 1983; Sohn y Hughes, 1981; Schnitzer, 1982). De los métodos estudiados, la mitad usaron cromatografía de intercambio catiónico: **M-HyO**, **M-K**, **M-OdeS**, **M-M**, **M-H**, y **M-SCH**.

En el **M-IIO** se utiliza Dowex 50W-X8, la cual consiste de un enrejado constituido por un copolímero poroso, insoluble, y fuertemente ácido, formado de estireno-divinilbenceno. Se unen al enrejado los grupos funcionales aniónicos (iones sulfito:  $\text{SO}_3^{-2}$ ), y unidos a estos se encuentran los cationes; mismos que representan la forma iónica de la resina (en este caso H) (Plummer, 1981; Bio Rad, 1991). Cuando el MH (que posee – en forma neta – la misma carga que los grupos funcionales de la resina) fluye a través de una columna con Dowex 50W-X8 protonado, se produce un intercambio catiónico donde los  $\text{H}^+$  que estaban unidos a los  $\text{SO}_3^{-2}$  son reemplazados por metales traza y otros cationes (incluyendo al Na de la solución extractora) que se encontraban a su vez unidos al MH; tal intercambio provoca que el pH del efluente disminuya de 13-14 a 3-5 debido al enriquecimiento en H del MH (Aiken, 1985; Plummer, 1981; Malcolm, 1989). De acuerdo a Thurman (1985), las resinas de intercambio catiónico retienen MO-lábil como aminoácidos y aminas, pero no hace referencia a una posible retención del mismo MH. Por otra parte, en el **M-IIO** se considera necesario la adición de H al MH, pues de lo contrario se concentrará cualquier soluto inorgánico presente. Además, existen los problemas de tipo comparativo e interpretativo que pueden sucitarse con una saturación iónica heterogénea, y que fueron comentados en la sección introductoria del presente trabajo.

### **Liofilización de Extractos Fúlvicos y Húmicos:**

La liofilización se realiza para evitar degradación química tanto del MH por extraer, como de las fracciones fúlvicas y húmicas purificadas. Además, Malcolm (1989) sugiere que el MH no debe secarse al aire libre, ya que el sólido resultante sería “duro”, “quebradizo”, y difícil de disolver. En cambio el MH liofilizado es “suave”, “flexible”, y fácil de disolver en solventes acuosos con pH ligeramente básico. La conveniencia de esta técnica de secado hace que todas las metodologías estudiadas y la **M-IIO** recurran a ella.

## ***INCONVENIENTES DE LAS METODOLOGIAS PREVIAS:***

Hay que aclarar que algunos aspectos inconvenientes de los métodos estudiados (en técnicas en común con las del **M-IIO**) ya fueron discutidos anteriormente.

### **Limpieza Orgánica Previa del Sedimento:**

De todas las metodologías estudiadas, solo el **M-M.F** (Gonzalez-Vila *et al.*, 1992) realiza en el sedimento una limpieza orgánica previa a la extracción del MH. Los autores mencionan que una solución de hexano/tolueno removerá MO-lábil que pudiese ser extraída junto con el MH, y por tanto contaminarlo orgánicamente. Aún cuando ningún otro método estudiado realiza la remoción de MO-lábil de esta manera, tampoco la han criticado o recomendado. Sin embargo, el **M-IIO** sostiene que la aplicación de una solución orgánica ya sea como en el **M-M.F** o inclusive siendo la solución de extracción, como en tres variantes del **M-P** y el sulfolano de Hayes (1985), puede generar una contaminación orgánica del MH-natural por reacciones de este con tales solventes. Por un lado, esto se fundamenta en que Rashid (1985) menciona que la gran reactividad que muestra el MH puede provocar intensas interacciones orgánicas-inorgánicas y orgánicas-orgánicas. Por otra parte, Hayes (1985) confirmó la adsorción del sulfolano al MH. Además, existió la posibilidad de contaminación orgánica en algunos AH-H obtenidos por Piccolo (1988), ya que se efectuaron extracciones con soluciones orgánicas e inorgánicas, y se obtuvo un mayor contenido de grupos metilo en el MH extraído orgánicamente (principalmente con DMSO y N,N-DMF). Debido a lo anterior, existe la posibilidad de formación de artificios fúlvicos y/o húmicos por el uso de solventes orgánicos para limpieza y/o extracción. Para evitar lo anterior el **M-IIO** utilizó soluciones inorgánicas para extraer al MH y cromatografía de adsorción para remover MO-lábil.

### **Neutralización del Sedimento:**

Una vez que el sedimento se lava con HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> diluidos para eliminar carbonatos, se le aplica NaOH 1M hasta alcanzar un pH  $\approx$  7 en la solución intersticial. De los métodos estudiados solo el **M-IHSS** aplica este tratamiento al sedimento. Esto se realiza con el fin de tener un pH neutro en la solución intersticial, justo antes de la aplicación de la solución extractora; ya que de lo contrario, disminuiría la cantidad de MH extraído al decrecer el pH requerido para una máxima extracción

(pH≈13-14). Para el **M-IIO** esta aplicación no es necesaria ni recomendable. Por una parte la neutralidad del sedimento bien puede alcanzarse con un lavado exhaustivo con agua destilada (aunque represente más trabajo y tiempo). Por otro lado la cantidad total de Na<sup>+</sup> en la solución intersticial, debido al NaOH 1M y a la solución de extracción, puede en si misma limitar la extracción de MH debido a la alta fuerza iónica. El MH debe extraerse con soluciones que presenten bajo contenido de Na, para conservar sitios aniónicos que puedan ser hidratados y hacer hidrofílico a dicho material. En caso contrario, la ausencia de sitios aniónicos libres daría al MH un caracter hidrofóbico, ya que el agua de la solución hidrataría más bien al exceso de iones Na<sup>+</sup> presentes.

### Congelado-Descongelado:

Solamente el método de Stevenson (Stevenson y Butler, 1969; y Stevenson, 1985), el **M-K**, y el **M-HyO** han incorporado a sus tratamientos de purificación de AH, una técnica propuesta desde 1947 por Forsyth y Fraser. Dicha técnica consiste en la realización de un congelado ( $\leq -3^{\circ}\text{C}$ ) → descongelado del AH, una vez que este ha eluido de una columna de intercambio catiónico. Forsyth y Fraser (1947) mencionan que tal procedimiento destruye sustancialmente las propiedades coloidales, el poder de adsorción, y la alta capacidad de retención de agua (hasta en 1/30 de la original) del AH-H. Como resultado de esto, los autores indican que el AH-H alcanza un alto grado de pureza; ya que una vez centrifugado se produce una separación del sólido (AH-H) y la fase acuosa, misma que incluye contaminantes inorgánicos solubles que pudiesen haber persistido al intercambio catiónico. El **M-IIO** no considera conveniente este procedimiento, ya que la eliminación de propiedades intrínsecas del AH puede generar cambios conformacionales que pudiesen afectar resultados de caracterización del mismo.

### Purificación con HCl/HF:

La utilización de HCl/HF para eliminar CI asociados al MH se lleva a cabo en cuatro métodos estudiados: **M-P**, **M-OdeS**, **M-SCH**, y **M-IHSS**. Sin embargo, autores como Hatcher *et al.*, (1985), Piccolo (1988), Rice y MacCarthy (1989), y Haddad *et al.*, (1990), mencionan que esta solución altera la composición original del MH. En particular, Piccolo (1988) demostró que el HCl/HF fue altamente efectivo para disminuir el contenido de CI de sus AH-H: 56.0% y 50.0% →

1.0% (en ambas), 8.20% → 2.48%, 11.80% → 1.10%, y 11.00% → 3.40%. A pesar de esto, Piccolo encontró que en relación a la distribución de pesos moleculares, el AH tratado con HCl/HF mostró un sustancial incremento hacia los pesos moleculares mayores, lo cual atribuyó a la ocurrencia de reacciones de condensación. Para este autor, el tratamiento con HCl/HF provoca modificaciones estructurales y composicionales en el AH; lo cual se traduce en resultados artificiales en razones de absorbancia de luz ( $E_4/E_6$ ), razones elementales e isotópicas, grados de solubilidad y condensación, tamaños y pesos moleculares, estabilidad química, acidez total, y reactividad superficial. Considerando lo anterior, el **M-IIO** no utilizó la solución de HCl/HF para eliminar la fracción inorgánica, y recurrió para ello a las técnicas de centrifugación, filtración, ciclos ácido ↔ base, y cromatografía de intercambio catiónico.

### Diálisis:

Una técnica muy utilizada para remover metales del MH es la diálisis (Stevenson, 1969; Shon y Hughes, 1981; e Inbar *et al.*, 1990). De hecho, esta se utiliza en ocho de los métodos estudiados: **M-PyF**, **M-K**, **M-OdeS**, **M-NyK**, **M-M**, **M-PyM**, **M-IHSS**, y **M-P**. Sin embargo, Holtzclaw *et al.* (1976), Vasconcelos *et al.* (1989), y Kipton *et al.* (1992) la han criticado severamente, argumentando que aún cuando la diálisis libera al MH de una cantidad importante de metales, también provoca pérdidas de fracciones de bajos pesos moleculares (las más reactivas); lo que resulta en un sesgo artificial hacia los mayores pesos moleculares del MH. Debido a esto, para realizar la remoción metálica el **M-IIO** recurre a los ciclos ácido↔base y al intercambio catiónico.

### Preconcentración:

La preconcentración se hace con el fin de liofilizar volúmenes pequeños. De las metodologías estudiadas, solo cuatro realizan este procedimiento: **M-K**, **M-H**, **M-OdeS**, y **M-PyM**. En todas ellas se utiliza rotoevaporador a 40°C – 60°C. Sin embargo la naturaleza acuosa de las soluciones fúlvicas y suspensiones húmicas, hacen que esta técnica sea tan lenta como la misma liofilización. El **M-IIO** ni usa ni recomienda la preconcentración; ya que no se da un ahorro de tiempo respecto a la liofilización, y la exposición del MH por tiempos prolongados a tales temperaturas podría crear modificación del mismo. Por tanto, el **M-IIO** liofiliza directamente al AF-H y al AH-H una vez que estos eluyen de la columna de intercambio catiónico.