UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LIGNITOS NACIONALES

Realizado por Diana Lizcano

Mayo, 2011

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LIGNITOS NACIONALES

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OPTAR AL TÍTULO DE LICENCIADA EN QUÍMICA**

Tutor Académico: Arnaldo Armado
Tutor Empresarial: Ángel Camejo

Realizado por Diana Lizcano
C.I.: 17.397.015

Mayo, 2011

*"Dedico este trabajo a mi familia, mis padres y hermanos, las personas más importantes en mi vida, quienes siempre me han enseñado a hacer lo correcto y a seguir adelante, sin importar cuantos obstáculos encuentre en el camino"*

## AGRADECIMIENTOS

*Quiero agradecer a todas aquellas personas que contribuyeron en el desarrollo de la investigación, en especial:*

***A Dios*** *por darme Salud e iluminarme el camino correcto hacia esta meta alcanzada.*

***A mi madre****, quien todos los días desde temprano se levanta para velar por el bienestar de mi familia, quien me dio el ejemplo de la perseverancia, quien estuvo pendiente de que estudiara y fuese responsable a lo largo de mi carrera y siempre me empujo a seguir adelante.* ***A mi padre*** *quien trabajó durante muchos años para lograr formar junto a mi madre, tres profesionales en mi familia, que con su apoyo, consejos y buen ejemplo me motivó a estudiar esta carrera. A ambos les doy las gracias por hacerme crecer y convertirme en la persona que hoy en día soy.* ***A mis hermanos*** *por siempre estar presente cuando los he necesitado, quienes me apoyaron y motivaron en mi carrera.*

***A mi tutor el Prof. Arnaldo Armado****, quien con su trabajo y dedicación formó parte importante en mi tesis, quien me apoyó y encaminó al pasar de los días y me impartió los conocimientos necesarios.*

***A la empresa PROMIVECA y al Lic. Ángel Camejo****, por su apoyo y por darme la oportunidad de formar parte de la investigación.*

***A todos los amigos*** *que conocí durante el transcurso de mi carrera quienes de una u otra forma me ayudaron a seguir adelante, en especial a la Lic. Carla Polo, quien con su ejemplo y apoyo me demostró que si era posible alcanzar la meta.*

***Al Prof. David Vega*** *quien siempre tuvo la respuesta correcta a todas mis preguntas y me colaboró todas las veces que le necesité de su ayuda.*

***A los especialistas de los laboratorios****: Beatriz Moy, Dioleidys González, Lesbia Martínez y Víctor Pérez. Gracias por todas las veces que me colaboraron.*

***A la facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo*** *por haberme permitido formar parte de esta casa de estudio*

*MUCHAS GRACIAS*

## ÍNDICE GENERAL


| CONTENIDO | Página |
|---|---|
| **RESUMEN** | I |
| **ABSTRACT** | III |
| **INTRODUCCIÓN** | 1 |
| **CAPITULO I** | |
| I.1. Planteamiento del problema. | 2 |
| I.2. Objetivos de la investigación. | 4 |
| I.2.1. Objetivos General. | 4 |
| I.2.2. Objetivos específicos. | 4 |
| I.3. Justificación. | 5 |
| **CAPITULO II. Marco Teórico** | |
| II.1. Antecedentes. | 7 |
| II.2. Fundamentos Básicos. | 10 |
| II.2.1. Definición de Lignito. | 10 |
| II.2.2. Tipos de Lignitos. | 10 |
| II.2.3. Origen del Lignito. | 11 |
| II.2.4. Composición de las Sustancias Húmicas. | 13 |
| II.2.5. Extracción de Sustancias Húmicas. | 17 |
| II.2.6. Aplicaciones de los Lignitos. | 19 |
| II.2.7. Técnicas de análisis estructural. | 23 |

**CAPITULO III. Marco Metodológico**


III.1. Muestra a emplear. 26

III.2. Análisis básico del material. 26

III.3. Análisis elemental del material. 28

III.3.1. Determinación del porcentaje total de carbono en las muestras. 28

III.3.2. Determinación del porcentaje de nitrógeno. 29

III.4. Análisis Molecular. 30

III.4.1 Extracción y fraccionamiento de las sustancias húmicas. 30

III.4.2. Determinación del porcentaje de carbono en cada fracción. 34

III.4.3. Determinación del número de neutralización de los ácidos húmicos. 34

III.4.4. Determinación del porcentaje de carbohidratos presentes en las muestras de lignito. 35

III.5. Análisis estructural. 35

III.5.1. Espectroscopía UV-visible. 35

III.5.2. Espectroscopía IR. 36

III.6 Parámetros en los lignitos para su posible uso en el mejoramiento de suelos agrícolas. 36

36

III.6.1. Capacidad de intercambio catiónico (CIC). 37

III.6.2. Actividad Microbiológica.

**CAPITULO IV. Resultados y Discusión**

IV.1. Caracterización fisicoquímica. 38

IV. 2. Determinación de parámetros en los lignitos para. su posible uso en el mejoramiento de suelos agrícolas. 45

IV. 3. Caracterización espectroscópica. 49

**CAPÍTULO V. Conclusiones y recomendaciones**

V. 1. Conclusiones. 53

V.2. Recomendaciones. 55

**REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS** 56

**APÉNDICE** 62

## ÍNDICE DE TABLAS


| Contenido | Página |
|---|---|
| TABLA 1. Grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas. | 16 |
| TABLA 2. Distribución de grupos funcionales oxigenados en sustancias húmicas. | 17 |
| TABLA 3. Extractantes para los constituyentes orgánicos del suelo. | 18 |
| Tabla 4. Relaciones $E_4/E_6$ obtenidas para ácidos húmicos de suelos venezolanos. | 24 |
| Tabla 5. Resultados obtenidos en los análisis básicos. | 39 |
| Tabla 6. Análisis elementales de los lignitos A y B. | 41 |
| Tabla 7. Porcentajes obtenidos en el fraccionamiento de la materia orgánica. | 43 |
| Tabla 8. Porcentajes obtenidos en el fraccionamiento de la materia orgánica de lignitos comerciales. | 43 |
| Tabla 9. Números de neutralización calculados para las muestras e intervalos de acidez reportados. | 44 |
| Tabla 10. Parámetros calculados para la evaluación del uso de lignitos en el mejoramiento de suelos. | 45 |
| Tabla 11. Datos de la determinación de humedad. | 62 |
| Tabla 12. Datos de la determinación de materia volátil. | 62 |

Tabla 13. Datos de la determinación de Cenizas y Carbono fijo. 63

Tabla 14. Datos de la determinación de carbono orgánico total en las muestras. 63

Tabla 15. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico total. 64

Tabla 16. Datos del fraccionamiento de la materia orgánica. 65

Tabla 17. Porcentajes encontrados en el fraccionamiento. 65

Tabla 18. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico en las fracciones tratadas con 4ml de Dicromato de potasio. 66

Tabla 19. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico en las fracciones tratadas con 2ml de dicromato. 67

Tabla 20. Datos para la determinación de carbohidratos totales. 68

Tabla 21. Datos para la curva de calibración para la determinación de carbohidratos totales. 68

Tabla 22. Datos para la determinación del número de neutralización. 69

Tabla 23. Datos para la determinación de la CIC. 69

Tabla 24. Datos para la determinación de actividad microbiológica. 70

Tabla 25. Datos para la determinación de la relación $E_4/E_6$. 70

## ÍNDICE DE FIGURAS


| Contenido | Página |
|---|---|
| Figura 1. Estructura hipotética de un Ácido Fúlvico. | 14 |
| Figura 2. Estructura hipotética de un Ácido Húmico. | 15 |
| Figura 3. Espectros IR-TF de tres órdenes de suelos venezolanos. | 25 |
| Figura 4. Bloque digestor DK 6 VELP SCIENTIFIC. | 30 |
| Figura 5. Agitador orbital AO-400 BUNSEN. | 31 |
| Figura 6. Centrifugación de las muestras. | 31 |
| Figura 7. Separación de ácidos fúlvicos y sustancias no húmicas con una columna de PVP. | 32 |
| Figura 8. Equipo liofilizador marca Telstar Modelo Cryodos. | 33 |
| Figura 9. Espectrofotómetro de doble haz marca LAMBDA. | 36 |
| Figura 10. Determinación de la actividad microbiológica en el Lignito A. | 47 |
| Figura 11. Determinación de la actividad microbiológica en el Lignito B. | 48 |
| Figura 12. Espectros UV-visible del Lignito A. | 50 |
| Figura 13. Espectros UV-visible del Lignito B. | 50 |
| Figura 14. Curva de calibración de Carbono orgánico. | 64 |
| Figura 15. Curva de calibración para las fracciones tratadas con 4ml de Dicromato de potasio. | 66 |

Figura 16. Curva de calibración para las fracciones tratadas con 2ml de dicromato de Potasio. 69

Figura 17. Curva de calibración para las determinación de carbohidratos. 68

Figura 18. Espectros IR de acido húmico proveniente de Lignito A. 71

Figura 19. Espectros IR de acido húmico proveniente de Lignito B. 71

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# CARACTERIZACIÓN FISICOQUÍMICA Y ESPECTROSCÓPICA DE LIGNITOS NACIONALES

**Mayo 2011**

Realizado por Diana Lizcano
Tutores: Arnaldo José Armado y Ángel Camejo

## RESUMEN

El Lignito es una roca de origen sedimentario, perteneciente a la familia del carbón, está contenido en su mayoría por materia orgánica de origen vegetal y su componente principal es el ácido húmico (30%). En el presente trabajo se realizó el estudio de dos tipos de lignitos nacionales, lignito A (LA) y Lignito B (LB), mediante caracterización fisicoquímica y espectroscópica. En las muestras de lignitos se analizaron distintos parámetros, tales como humedad (15.8% para LA y 9.8 para LB), contenido de carbono orgánico (47% para LA y 38% para LB), capacidad de intercambio catiónico (51 y 35 cmol/kg lignito en LA y LB, respectivamente), actividad microbiológica como respiración basal (3 y 2.9 mg$CO_2$/Kg lignito*Días totales), entre otros. Se realizó el fraccionamiento de la materia orgánica usando NaOH como extractante. Los ácidos húmicos extraídos se purificaron y caracterizaron mediante espectroscopia de la determinación del contenido de grupos carboxílicos y fenólicos, espectroscopía UV-visibles, espectroscopia IR y la relación $E_4/E_6$. Los lignitos estudiados presentaron porcentajes diferentes en la mayoría de los análisis realizados (humedad, materia volátil, cenizas y carbono fijo). Se observó que los ácidos húmicos contienen menor carácter aromático en comparación con otros lignitos debido a que poseen una relación $E_4/E_6$ un poco alta siendo en LA 5.7 y 5.8 en LB. Por otro parte su acidez se encuentra entre los intervalos reportados para estos ácidos. Se

puede decir que el Lignito A presenta mejores propiedades al contener mayor contenido de materia orgánica y una elevada capacidad de intercambio catiónico, factores importantes en la utilización de lignitos como aditivo en mejoramiento de suelo.

UNIVERSIDAD DE CARABOBO
FACULTAD EXPERIMENTAL DE CIENCIAS Y TECNOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

# PHYSICOCHEMICAL AND SPECTROSCOPIC CHARACTERIZATION OF NATIONAL LIGNITE

**Mayo 2011**

Made by Diana Lizcano
Tutors: Prof. Arnaldo Armado y Lic. Angel Camejo

The Lignite is a rock of sedimentary origin belonging to the family of coal, mostly contained in organic matter of vegetable origin and its main component is humic acid (30%). In the present study was studied two types of lignite, lignite A (LA) and lignite B (LB) by physicochemical and spectroscopic characterization. In the lignite samples were analyzed parameters such as moisture (15.8% for LA and 9.8 for LB), organic carbon content (47% to 38% for LA and LB), cation exchange capacity (51 and 35 cmol/kg lignite in LA and LB, respectively), microbial activity as basal respiration (3 and 2.9 mgCO2/Kg lignite * Total days), like others. Fractionation of organic matter was made using NaOH as an extractant. Extracted humic acids were purified and characterized by determination of carboxylic and phenolic groups, obtaining UV-visible spectra, E4/E6 ratio, and IR spectra. Lignites studied showed different rates in most of the analysis. It was observed that humic acids contain less aromatic character than other lignites because they have a high E4/E6 ratio being in the 5.7 and 5.8 in LB. On the other hand its acidity is between the ranges reported for these acids. We could say that the lignite has better properties because contain more organic matter content and high cation exchange capacity are important factors in the use of lignite as an additive for soil improvement.

# INTRODUCCIÓN

El lignito pertenece a la familia del carbón, está contenido en su mayoría por materia orgánica de origen vegetal y sus componentes principales son los ácidos húmicos. Puede ser utilizado en varias aplicaciones industriales tales como aditivo en lodos de perforación, mejoramiento de suelos, entre otras. Actualmente, el lignito utilizado en la industria venezolana es importado de otros países lo que acarrea costos de importación y traslado.

Con el fin de dar uso al lignito venezolano nace de parte de Productos Minerales de Venezuela C.A. (PROMIVECA) el interés de estudiar detalladamente la composición de muestras extraídas en el país.

Para lograr la caracterización de las muestras se llevó a cabo métodos como la Determinación de Carbono según Walkley y Black modificado (Walinga y col, 1992) y el fraccionamiento de materia orgánica basado en diferencias de reactividad en medios ácidos y básicos como el descrito por Ciavatta (1991); entre otros análisis. Se utilizaron técnicas espectroscópicas como el UV-visible y el IR para el análisis estructural de los ácidos húmicos presentes en las muestras.

La utilización de distintos métodos y técnicas de análisis fueron la clave fundamental para la correcta caracterización de las muestras de lignito nacional investigado, para su posterior uso en la industria venezolana. Esta investigación proporcionará información importante que le permitirá a la empresa desarrollar nuevos productos utilizando materia prima del país, productos que posteriormente serán dirigidos al mercado venezolano, lo que constituye un fortalecimiento en la economía nacional.

# CAPITULO I

## I.1. Planteamiento del problema

En Venezuela existen yacimientos de lignitos disponibles para ser explotados como los existentes en el occidente del país en el Edo. Táchira. Esta roca cuenta con varias aplicaciones industriales.

Se puede usar como aditivo en la fabricación de lodos de perforación, los cuales aportan beneficios cuando se realiza la perforación de un pozo petrolero.

A medida que la industria fue creciendo se han ido creando diferentes tipos de lodos que controlan variables en el proceso de perforación, uno de los progresos fue la utilización del lignito como aditivo de dichos lodos, el cual reduce la floculación en los fluidos base agua-arcilla (Osorio, 2009).

Otra de las aplicaciones en las cuales el lignito nacional podría usarse es en el mejoramiento de suelos agrícolas.

Esta roca contiene sustancias húmicas que aportan distintas propiedades tales como el intercambio iónico, el cual propicia la retención de nutrientes para las plantas (Humitech, 2005).

En ambas aplicaciones es necesario conocer la composición y características de dicho material.

En el caso de la fabricación de un lodo base aceite que contenga como aditivo el lignito nacional, es necesario estudiar la composición y estructura de la sustancias húmicas (SH) presentes en el mismo, para poder

evaluar su interacción en medio básico, con surfactantes catiónicos (aminas) y de esta manera proporcionar afinidad al lignito en medios orgánicos.

En el caso de suelos para uso agrícola es importante que presenten características adecuadas para ser cultivados. La presencia de problemas como baja fertilidad de los mismos, disminución de los microorganismos útiles para el suelo, incremento de la erosión y desertificación y la acumulación de residuos tóxicos como por ejemplo herbicidas, como consecuencia del uso de fertilizantes inorgánicos (Humitech, 2005), son problemas que se deben disminuir utilizando aditivos que mejoren las condiciones de la siembra.

Con la intensión de utilizar esta roca y generar alternativas a la importación de la misma, es como surge de parte de PROMIVECA el interés de estudiar la caracterización del lignito nacional para poder evaluar la aplicación en donde este sea eficiente, proporcionar un producto de calidad y se puedan aprovechar los recursos minerales que nuestro país nos aporta.

Con este estudio se planteó realizar la caracterización de dos tipos de lignitos, utilizando métodos fisicoquímicos, espectroscopía UV-visible e Infrarrojo.

## I.2. Objetivos de la investigación

### I.2.1. *Objetivo general*

Caracterizar fisicoquímica y espectroscópicamente dos lignitos nacionales para su posible uso en diferentes aplicaciones industriales y/o agrícolas.

### I.2.2. *Objetivos específicos*

I.2.2.1. Determinar el porcentaje de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo presentes en las muestras de Lignito A y B.

I.2.2.2. Determinar el porcentaje de Nitrógeno y Carbono presentes en las muestras de lignito A y B y en los Ácidos Húmicos y Fúlvicos.

I.2.2.3. Determinar el Porcentaje de Ácidos Húmicos (AH), Ácidos Fúlvicos (AF), Sustancias no húmicas (SNH) y Carbohidratos presentes en las muestras de Lignito A y B.

I.2.2.4. Evaluar el número de neutralización de los Ácidos Húmicos.

I.2.2.5. Obtener y analizar los espectros UV/visible de Ácidos Húmicos y Fúlvicos en 3 solventes (hexano, diclorometano y metanol).

I.2.2.6. Obtener y analizar los espectros de IR para los Ácidos Húmicos y Fúlvicos.

I.2.2.7. Determinar la capacidad de intercambio iónico en las muestras de lignito A y B.

I.2.2.8. Determinar la actividad microbiológica presente en las muestras de lignito A y B.

## I.3. JUSTIFICACIÓN

La investigación descrita se realizó con muestras suministradas por PROMIVECA. Una vez realizado el análisis de componentes básicos se llevó a cado el fraccionamiento de la materia en cada muestra, para obtener los ácidos húmicos y fúlvicos presentes y caracterizarlos espectroscópicamente.

Estos procedimientos se llevaron a cabo con el fin de profundizar el conocimiento que se tiene de dichos lignitos, estudiando la composición y estructura de la sustancias húmicas. Con este estudio PROMIVECA logrará proporcionar afinidad al lignito en medios orgánicos, particularidad que se busca para producir lodos base aceite, utilizados en las perforaciones de pozos petroleros.

Los lodos se han ido desarrollando para mejorar el desempeño durante la perforación respecto a sus contrapartes base agua. Las mayores velocidades de penetración, la mejor estabilidad de pozo y la mejor lubricación que ofrecen estos fluidos los hacen la mejor opción técnica viable para aplicaciones exigentes tales como los pozos de alcance extendido y los pozos de alta temperatura y presión (Cheung y col, 2002).

Además de la utilización del lignito como aditivo en fluidos de perforación, se puede utilizar en el mejoramiento de suelos agrícolas.

Las SH tienen profundos efectos físicos, químicos y biológicos sobre el suelo, especialmente sobre aquellos que presentan condiciones físicas que dificultan la producción de cultivos; pueden tener efecto estimulante para el crecimiento de las plantas; y adicionalmente, influyen en la movilidad de los compuestos orgánicos no iónicos como pesticidas y contaminantes, removiéndolos de las soluciones acuosas.

Además, las SH retienen los nutrientes por sus propiedades de intercambio iónico y son fuente de Nitrógeno, Fosforo y Azufre para las plantas (Stevenson, 1994; Popov, 2008). Por estas razones son consideradas como los constituyentes más importantes de la materia orgánica del suelo ya que influyen directa o indirectamente sobre su fertilidad (Swift, 1991).

No obstante, la actividad de la materia orgánica en el suelo, depende en gran medida de su calidad, más que de su cantidad, y es conocido que la composición y propiedades de la materia orgánica del suelo, como componente de éste, están influenciadas por los procesos naturales de formación de suelos, controlados por la interacción de los factores formadores (clima, relieve, organismos, etc.) (Stevenson, 1982).

Por estas razones es conveniente investigar los componentes de los lignitos conociendo así la calidad que representarían para un suelo que requiera de un mejoramiento para su uso en fines agrícolas.

# CAPÍTULO II

# MARCO TEÓRICO

## II. 1. Antecedentes

A continuación se presentaran estudios realizados por otros investigadores referentes al tema de estudio:

Agarwal y col. (2010) realizaron una caracterización fisicoquímica y espectroscópica de ácidos húmicos. El objetivo fue extraer ácidos húmicos de Shilajit (planta medicinal) de diversas fuentes y caracterizar estos ácidos húmicos sobre la base de sus propiedades fisicoquímicas, análisis elemental, de UV / Vis y espectros de FTIR, rayos X y DSC. Las características espectrales obtenidas a partir de las técnicas utilizadas de muestras de diferentes orígenes mostraron una similitud clara entre sí y en comparación con los ácidos húmicos del suelo. Los espectros IR que realizaron Agarwal y col, aportan información útil para comparar con los resultados que se obtuvieron en esta investigación.

Rodríguez y colaboradores (2009) realizaron la extracción secuencial y caracterización fisicoquímica de ácidos húmicos (AH) de diferentes compost. Según los autores las sustancias húmicas contenidas en un compost, así como sus características fisicoquímicas son responsables de su calidad y de la respuesta de los cultivos a sus aplicaciones.

Entre sus conclusiones destaca que al utilizar diferentes soluciones de extracción se pudo constatar que el NaOH es el más efectivo y con el que se logran mayores porcentajes de extracción de ácidos húmicos. En base a esto se decidió utilizar en esta investigación una solución de NaOH para

realizar la extracción de los AH presentes en las muestras de lignitos, a pesar de que las muestras de ambos estudios no son iguales, contienen materia orgánica.

Li y colaboradores (2004), estudiaron la caracterización de ácidos húmicos (AH) fraccionados por ultrafiltración. Se uso turba como muestra problema, proveniente de la ciudad de Pahokee, Florida. Realizaron el fraccionamiento de la materia orgánica, utilizando ácido y base. Una vez tratadas las muestras y encontrada las fracciones de AH realizaron la caracterización espectroscópica mediante cromatografía de gases, infrarrojo, UV-visible y RMN, con el fin de estudiar las cualidades de las muestras.

Los resultados muestran que cada fracción AH tiene baja polidispersidad (distribución relativamente estrecha de tamaños moleculares) observados en los cromatógrafos de HPLC, lo que sugiere que la técnica de ultrafiltración es eficaz para el fraccionamiento de macromoléculas húmicas ampliamente heterogéneo en fracciones relativamente homogéneas.

La espectroscopia UV-VIS y análisis Py-GC-MS indican que las fracciones con menor peso molecular tienen más grupos funcionales heterogéneos, mayor relación O/C, y un mayor contenido de oxígeno y unidades estructurales aromáticas derivadas de lignina. Por el contrario, las fracciones de AH con mayor peso molecular tienen un menor contenido de oxígeno y unidades estructurales aromáticas que corresponden a una relación mayor de H/C y una relación inferior O/C.

Este estudio sugiere que los ácidos húmicos formados en las mismas condiciones biogeoquímicas pueden consistir en macromoléculas con una amplia serie de propiedades moleculares, químicas y estructurales. Esta investigación aportó una base para el estudio espectroscópico.

Rivero, C. (2001), estudió la caracterización de la materia orgánica estable del suelo. Este trabajo constituyó una revisión en el área de evaluación y caracterización de la materia orgánica. Se revisaron técnicas tales como el análisis elemental, espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS), espectroscopía infrarrojo (IR), entre otras.

El autor recomienda que la ejecución de manera conjunta de al menos dos de las técnicas basadas en la espectroscopia visible la cual está ampliamente difundida y en general, es de bajo costo, podría ayudar a disponer de una información que al menos permita una garantía mínima en la toma de decisiones del manejo de un determinado suelo, con ello se espera ir siempre en la dirección de lograr la sostenibilidad de los agrosistemas.

Este estudio está dirigido a suelos, sin embargo la metodología de análisis de espectrofotometría y los resultados se pudieron comparar con los obtenidos en esta investigación ya que, al igual que Rivero, se evaluó materia orgánica.

Ramos, R. (2000), evaluó la aplicación de sustancias húmicas comerciales, provenientes de lignitos, turbas y residuos vegetales, como productos de acción bioestimulantes. Con el desarrollo de este trabajo se determinaron dosis óptimas de aplicación de sustancias húmicas comerciales sobre un cultivo de tomate, de gran importancia económica, en invernadero y fertirrigado; entre otras determinaciones. Este estudió sirvió para comparar los resultados de los lignitos reportados por el autor con los resultados obtenidos en la caracterización fisicoquímica de los lignitos estudiados.

## II. 2. Fundamentos básicos

### *II.2.1. Definición de Lignito*

El Lignito es una roca de origen sedimentario con propiedades combustibles, cuyo proceso de evolución es intermedio entre la turba y la hulla. Los lignitos se diferencian de los carbones más antiguos por su color, que varía del pardo al negro; por su textura amorfa y fibrosa; por su contenido de humedad, que puede alcanzar hasta un 60% en los casos extremos y por su porcentaje de carbono, no mayor a 80%.

Como componentes adicionales, presenta en poca cantidad, minerales arcillosos, siderita, pirita y calcita. Los lignitos sólo aparecen en sedimentos no compactados o muy poco compactados (Garreaud y col, 2004).

### *II.2.2. Tipos de Lignitos*

*Pardo-terrosos o fibrosos* próximos a las turbas en aspecto y propiedades, de color pardo claro y textura fibrosa.

*Leñosos o xifoides* de color pardo claro y con aspecto leñoso, constituidos por madera carbonificada cuya estructura conserva.

*Carbones pardos amorfos* sin reserva de fibras vegetales.

*Lignitos negros o carbones sub-bituminosos* de color pardo oscuro a negro, de aspecto mate o con brillo sedoso, en ocasiones con bandas brillantes o mate como los carbones bituminosos (GEA, 2000).

### *II.2.3. Origen del Lignito*

Los carbones en general y los lignitos en particular se originan a partir de materia orgánica de origen vegetal, acumulados en grandes cantidades durante diversos períodos geológicos y han permanecido cubiertos por agua y experimentado dos etapas de transformación: etapa bioquímica y etapa geoquímica.

La formación de los yacimientos pudo realizarse por dos modalidades diferentes: autóctona y alóctona, que se depositan junto con algunos minerales y sedimentos.

En la autóctona, también denominada *in situ*, las plantas que dieron origen al lignito crecieron en una zona que sufrió inundaciones periódicas. Cuando el terreno estaba sin humedad, crecían árboles bastante grandes; al sobrevenir la inundación los árboles se mueren y los troncos caen, pero una parte del árbol y sus raíces permanecen por un tiempo. Durante la inundación se depositan sedimentos que posteriormente aparecen en el carbón en forma de finos lechos de materia mineral.

En la formación *alóctona* los restos de vegetales son arrastrados por las corrientes de agua depositándolos en los remansos donde sufren el proceso de carbonificación. Éste puede tener lugar en aguas dulces (cuencas límnicas) o salobres (cuencas parálicas). Las plantas que dieron origen a los lignitos pueden identificarse por los restos que se encuentran allí, mucho mejor conservados que en el caso de las hullas (GEA, 2000).

En el proceso de formación del lignito está presente la humificación, la cual consiste, según Kumada (1987), en un conjunto de procesos que transforman la materia orgánica en compuestos con alta capacidad de

absorción de la luz visible y altos contenidos de grupos orgánicos carbonilo y carboxilo.

Cuando los restos orgánicos se descomponen, se liberan elementos nutritivos para la planta, principalmente $NH_3$, $NH_4^+$, $NO_3^-$, $SO_4^{2-}$, $PO_4^{3-}$, $Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$, $K^+$, $Na^+$, además de agua y $CO_2$.

Para que se favorezcan los procesos de humificación se debe presentar déficit de oxigeno, baja temperatura, materiales leñosos (relación C/N alta) y exceso de humedad (deficiente aireación), y acumulación de la materia orgánica en el suelo.

Dependiendo de las condiciones ambientales y de la calidad de la materia orgánica, se pasa de la etapa de alteración, a un proceso de transformación con un aporte bajo en nutrientes y alto en suministro de materiales disponibles para la polimerización y acumulación en el suelo como humus.

El humus es el conjunto de materia orgánica amorfa, poliméricos, de alto peso molecular y de color amarillo hasta gris oscuro o casi negro, que se acumulan en el suelo como consecuencia de su resistencia a la transformación. Se diferencian y agrupan de acuerdo con su solubilidad, peso molecular y grado de polimerización, según varios autores citados por Burbano (1989).

El humus está formado por una cantidad enorme de distintos constituyentes, pero generalmente son clasificados en dos grupos: SH y SNH.

Las SH son complejas agrupaciones macromoleculares en las que las unidades fundamentales son compuestos aromáticos de carácter fenólico procedentes de la descomposición de la materia orgánica y compuestos

nitrogenados, tantos cíclicos como alifáticos sintetizados por ciertos microorganismos presentes en la biomasa (Lesser, 1995).

La intensidad de biodegradación es menor que la de los compuestos no húmicos y decrece con el aumento del peso molecular (Steveson, 1994). Se encuentran asociadas mediante uniones de carácter débil a otra fracción orgánica, denominada sustancias no húmicas (Shulten y Schnitzer, 1993).

Las SNH son materia orgánica con estructura química definida, constituida fundamentalmente de aminoácidos, carbohidratos y lípidos que por lo general es materia orgánica de fácil biodegradación (Schnitzer y Khan, 1972).

### *II.2.4. Composición de las sustancias húmicas*

*Ácidos Fúlvicos*: Son compuestos de bajo peso molecular, alta acidez (entre 900 y 1400meq/100g), bajo grado de polimerización, solubles en medio básico y ácido.

Presentan mayor contenido de oxigeno y son menores en contenido de carbono, por ello presentan mayor cantidad de grupos funcionales oxigenados en su estructura tales como: COOH, OH ó C=O, debido a esto poseen alta acidez, mayor que la de los ácidos húmicos.

La capacidad quelatante de metales en los ácidos fúlvicos es elevada debido a la presencia de estos grupos funcionales en su estructura. Esta información y la posible estructura de un acido fúlvico fue dada por Schnitzer y Kan en 1972, la cual puede ser observada en la figura 1.

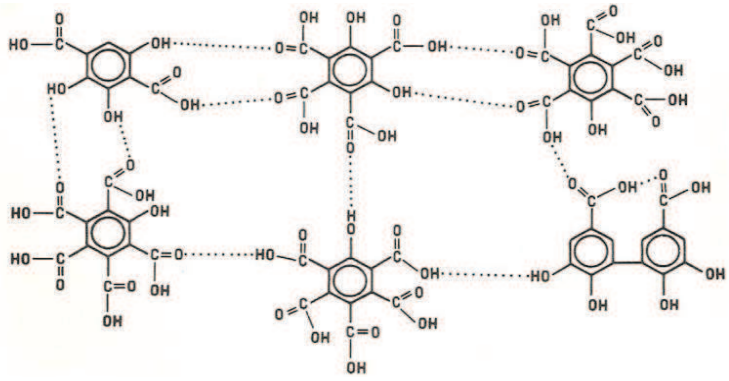


**Figura 1. Estructura hipotética promedio de un Ácido Fúlvico**

*Fuente: Schnitzer y Khan (1972)*

*Ácidos Húmicos:* Son compuestos de alto peso molecular, baja acidez (entre 500 y 870meq/100g), alto grado de polimerización, solubles en álcali, pero precipitan en medio ácido. Según Gallardo (1994), los ácidos húmicos por poseer elevado peso molecular, tienen una serie de propiedades relacionadas con el estado coloidal muy diferentes a las del acido fúlvico, por ende, su poder de retención de agua y su capacidad de intercambio catiónico son más elevadas.

La estructura hipotética promedio de los ácidos húmicos (ver figura 2) está compuesta en gran medida por anillos aromáticos unidos entre si y a otras estructuras de carácter alifático; en este esqueleto la mayor parte del oxigeno se encuentra formando parte del núcleo o estructura central haciendo uniones éter o éster (Shulten y Schnitzer, 1993).

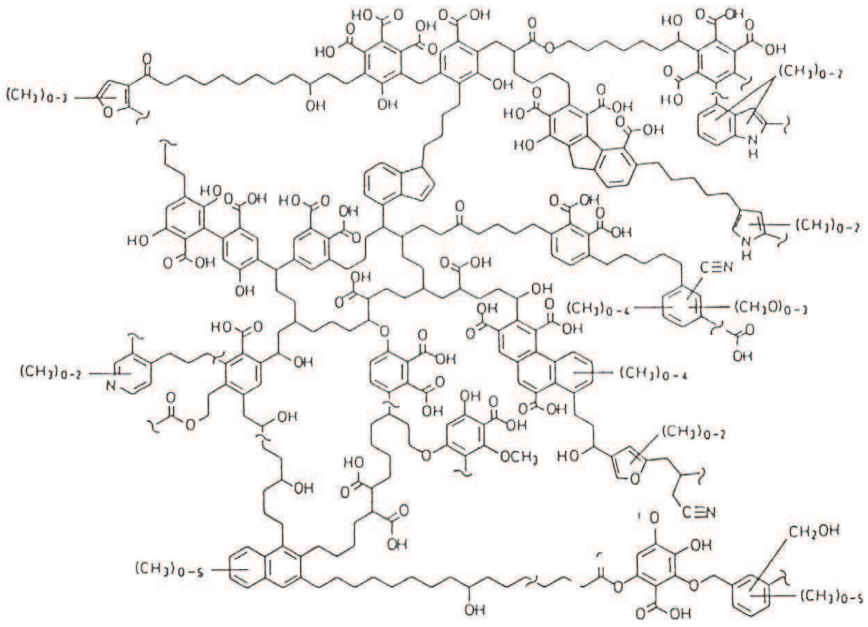


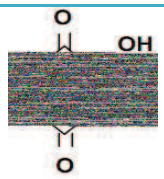
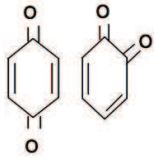
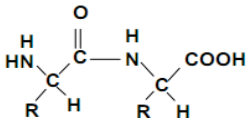
**Figura 2. Estructura hipotética promedio de un Ácido Húmico**

*Fuente: Shulten and Schnitzer (1993)*

*Huminas*: Se refieren a la fracción del humus más resistente a la descomposición que no es soluble, ni en ácido, ni en álcali; Paul y Clark (1989) sugieren que está compuesta por mezclas de ácidos fúlvicos y húmicos con otros componentes no solubles provenientes de plantas y microorganismos, como celulosa, lignina, paredes celulares y carbón.

Una vez definidas las sustancias húmicas podemos observar en las tablas 1 y 2, los grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas y como se distribuyen en las mismas.

**TABLA 1. Grupos funcionales presentes en las sustancias húmicas**

| Grupo funcional | Estructura | Grupo funcional | Estructura |
|---|---|---|---|
| **AMINO** | $R\text{-}CH_2\text{-}NH_2$ | **ANHÍDRIDO** | R-CO-O-CO-R |
| **IMINO** | R-CHNH | **ETER** | $R\text{-}CH_2\text{-}O\text{-}CH_2\text{-}R'$ |
| **AMIDO** | $R\text{-}CO\text{-}NH_2$ | **ESTER** | R-COOR´ |
| **ALCOHOL** | $R\text{-}CH_2\text{-}OH$ | **CARBOXILO** | R-COOH |
| **ALDEHÍDO** | R-COH | **CARBOXILATO** | $R\text{-}COO^-$ |
| **ENOL** | R-CH=CH-OH | **CETONA** | R-CO-R´ |
| **CETO- ÁCIDO** | R-CO-COOH | **CARBONILO α,β** | -CH=CH-CHO |
| **HIDROXIQUINONA** |  | **QUINONA** |  |
| **PEPTIDO** |  | | |

*Fuente: Schnitzer (1990)*

**TABLA 2. Distribución de grupos funcionales oxigenados en sustancias húmicas**

| Grupo funcional | ÁCIDOS HÚMICOS (meq/100g) | ÁCIDOS FÚLVICOS (meq/100g) |
|---|---|---|
| **ACIDEZ TOTAL** | 560 – 890 | 640 – 1420 |
| **COOH** | 150 – 570 | 520 – 1120 |
| **OH acídicos** | 210 – 570 | 30 – 570 |
| **OH alcohólicos y débilmente ácidos** | 20 – 490 | 260 -950 |
| **C=O cetónicos y de quinonas** | 30 – 140 | 120 – 420 |
| **$OCH_3$** | 30 – 80 | 30 – 120 |

*Fuente: Stevenson (1994)*

### *II.2.5. Extracción de las sustancias húmicas*

La mayor parte de la materia orgánica de los suelos y sedimentos se encuentra en formas insolubles como complejos macromoleculares aislados o unidos mediante cationes di y trivalentes ($Ca^{+2}$, $Fe^{+3}$ y $Al^{+3}$) en combinación con componentes inorgánicos como arcillas (complejo arcillo-húmico).

Las sustancias húmicas, permanecen insolubles en la solución del suelo cuando sus cargas están saturadas por cationes divalente y trivalente, o por iones hidrógeno; cuando estos son remplazados por cationes monovalentes como $Na^+$ y $K^+$, tiene lugar la solvatación de los polianiones que se disuelven en agua.

Se han ideado diversas metodologías para el fraccionamiento de la materia orgánica, en donde el fundamento es la solubilidad de las diferentes fracciones que la conforman (Kononova, 1966). Uno de los factores más importantes en dichas metodologías es el extractante empleado, el cual debe cumplir las condiciones siguientes:

1) Extracción de las sustancias húmicas sin alterarlas.
2) El método debe ser universal.
3) La extracción debe ser completa o al menos que represente las fracciones de distinto peso molecular.

Hasta la actualidad no se ha logrado conseguir ningún extractante que cumpla con todas las condiciones, sin embargo los más empleados se muestran en la tabla 3.

**TABLA 3. Extractantes para los constituyentes orgánicos del suelo**

| TIPO DE MATERIAL | EXTRACTANTE | MATERIA EXTRAIDA (%) |
|---|---|---|
| SUSTANCIA HÚMICA | ***Bases fuertes*** | |
| | NaOH | Hasta 80% |
| | $Na_2CO_3$ | Hasta 30% |
| | ***Sales neutras*** | |
| | $Na_4P_2O_7$, NaF | Hasta 30% |
| | sales orgánicas | Hasta 30% |
| | ***Quelatos*** | |
| | Aceltilacetona Cupferrón 8-hidroxiquinoleina | Hasta 30% |
| | Acido Fórmico | Hasta 55% |
| | Acetona/ $H_2O$/HCl | Hasta 20% |

*Fuente: Stevenson (1994).*

Como se observa en la tabla anterior existen varios extractantes, útiles para el fraccionamiento de la materia orgánica, en este caso se utilizara la extracción alcalina. En ella se emplean soluciones alcalinas, generalmente hidróxidos, como NaOH y KOH en concentraciones que van desde 0.1M a 0.5M. Se suele realizar extracciones sucesivas para obtener un mayor rendimiento.

Normalmente la muestra pasa por un pre tratamiento que consiste en lavar con ácido clorhídrico para así poder eliminar el calcio y otros cationes polivalentes presente en la muestra que puedan alterar la extracción. Con esta técnica se pueden extraer 2/3 de la materia orgánica.

El fraccionamiento químico de las sustancias húmicas es una técnica muy importante al caracterizar los lignitos, ya que nos permite la cuantificación de dichos ácidos y su posterior análisis estructural (Broadbent, 1965).

### *II.2.6. Aplicaciones de los lignitos*

El lignito se ha utilizado al pasar de los años en diferentes áreas de la industria. Ha formado parte de la producción de energía para centrales eléctricas por medio de su combustión; se introdujo como aditivo en lodos de perforación y ha llegado a formar parte del mejoramiento de suelos que han sido afectados por la contaminación.

Además de su utilización directa para combustión en centrales de producción de energía eléctrica, los lignitos han sido y son una excelente materia prima para la obtención de combustibles líquidos y gaseosos exentos de cenizas y heteroátomos (oxígeno, azufre y nitrógeno) (GEA, 2000).

***El lignito como aditivo en lodos de perforación petrolera***

Los lodos de perforación son fluidos compuestos por una mezcla de un solvente (base) con aditivos ó productos, que cumplen funciones fisicoquímicas específicas, de acuerdo a las necesidades operativas de una formación a perforar.

Según Osorio (2009) debido a que la viscosidad resulta de los esfuerzos de fricción y de los esfuerzos eléctricos que existen dentro de un sistema de lodo, los sólidos se incorporan dentro del lodo de perforación a medida que la perforación va avanzando. Estos son triturados y se descomponen en partículas muy finas, causando un aumento de la viscosidad del lodo, a menos que sean retirados del sistema. La perforación a través de varios contaminantes también causa la floculación y un aumento de la viscosidad.

Existen varios aditivos no iónicos orgánicos e inorgánicos que pueden ser usados para reducir eficazmente la floculación. Se considera que el efecto principal de los productos químicos reductores de viscosidad es la neutralización de las cargas catiónicas de enlaces rotos residuales. El mecanismo de esta acción en suspensiones de arcilla en agua consiste en reducir la porción de la viscosidad causada por las fuerzas de atracción entre las partículas, sin afectar considerablemente la porción de la viscosidad que se debe a la hidratación de los minerales arcillosos.

Los productos químicos de carga aniónica que se usan comúnmente para el tratamiento del lodo de perforación incluyen fosfatos, taninos, ligninas de ácido húmico (lignito), lignosulfonatos y polímeros sintéticos de bajo peso molecular. Esta adsorción modifica el equilibrio de las fuerzas que actúan sobre la partícula de arcilla, pasando de una fuerza de atracción (floculación)

a una fuerza repulsiva (desfloculación). En vez de unirse, las partículas se rechazan o tienden a evitar cualquier contacto entre ellas.

Los agentes de tratamiento químico como aquellos que contienen lignito, reducen la floculación en los fluidos de perforación base agua-arcilla, mediante uno o varios de los siguientes mecanismos:

- Eliminando el contaminante mediante precipitación.
- Reduciendo los efectos del contaminante mediante la complejación del contaminado (secuestro).
- Neutralizando la floculación de las cargas catiónicas en las partículas de arcilla.
- Encapsulando o formando una película protectora alrededor de la partícula de arcilla.

Entre algunas de las funciones principales de los lodos se tiene (Aguilar, 2008):

1. Evacuar los recortes de perforación. La remoción de los recortes (limpieza del pozo) depende del tamaño, forma y densidad de los recortes, unidos a la velocidad de penetración, de la rotación de la columna de perforación y de la viscosidad, densidad y velocidad anular del fluido de perforación.

2. Controlar las presiones de la formación. A medida que la presión de la formación aumenta, se aumenta la densidad del fluido de perforación para equilibrar las presiones y mantener la estabilidad de las paredes. Esto impide además, que los fluidos de formación fluyan hacia el pozo.

3. Mantener la estabilidad del pozo. La estabilidad del pozo constituye un equilibrio complejo de factores mecánicos (presión y esfuerzo) y químicos. La

composición química y las propiedades del lodo deben combinarse para proporcionar un pozo estable hasta que se pueda introducir y cementar la tubería de revestimiento.

4. Enfriar, lubricar y alivianar la columna de perforación. La circulación del fluido de perforación enfría la barrena y el conjunto de perforación, alejando el calor de la fuente (fricción) y distribuyéndolo en todo el pozo. La circulación del fluido de perforación enfría la columna de perforación hasta temperaturas más bajas que la temperatura de fondo. Además de enfriar, el fluido de perforación lubrica la columna de perforación, reduciendo aún más el calor generado por fricción.

### *El lignito como mejorador de suelos para usos agrícolas*

Otras de las aplicaciones importantes de los lignitos se deben al contenido de ácidos húmicos que tienen grandes beneficios en el mejoramiento de suelos.

En suelos arcillosos los ácidos húmicos promueven la aireación de los mismos y mejoran su estructura. De esta manera el agua, los elementos nutritivos y las raíces pueden penetrar más fácilmente (Humitech, 2005).

En suelos arenosos con muy poco humus, los ácidos húmicos atrapan las partículas de arena, incrementando la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y la capacidad de retención de humedad y de elementos nutritivos. Por lo tanto los ácidos húmicos evitan la lixiviación de los nutrientes hacia aguas subterráneas, sobre todo del nitrato. Estos son retenidos en el suelo con el agua, quedando así disponibles para las plantas.

En los suelos ácidos, los ácidos húmicos tienden aumentar el pH neutralizando la acidez presente, debido a su alta capacidad amortiguadora. De esta manera, la alteración causada por el ácido en las raíces de las plantas se reduce. Los ácidos húmicos fijan e inmovilizan los elementos nocivos para las plantas, particularmente el aluminio y los metales pesados. De esta manera la toxicidad se reduce y se libera el fosfato unido por el aluminio.

En los suelos alcalinos, por causa de su alto pH, muchos elementos nutritivos vitales y muchos oligoelementos no están a disposición de las plantas. Por la formación de complejos, los ácidos húmicos amortiguan el alto pH y convierten los elementos nutritivos y los oligoelementos en forma disponibles para las plantas. El fosfato fijado por el calcio se libera de nuevo y así se convierte en disponible para las plantas. Los ácidos húmicos aumentan la capacidad de retención de humedad del suelo. Por lo tanto también en períodos secos las plantas tienen agua a su disposición. De esta manera se evitan situaciones de perturbación causadas por sequía y el derroche de agua se reduce (Humitech, 2005).

### II.2.7. *Técnicas de análisis estructural*

Se utilizaron dos técnicas espectroscópicas para analizar estructuralmente las muestras fraccionadas:

***Espectroscopía ultravioleta visible (UV-VIS):*** La producción de bandas de absorción de radiación, en el sector del UV-VIS, cuando se analizan las SH, se origina por la presencia de anillos aromáticos, dobles enlaces u orbitales electrónicos deslocalizados, que poseen bajas energías de excitación y se encuentran en las moléculas. Un registro de estas bandas

permite calcular la absortividad molar de las SH y la magnitud de la absorción para diferentes longitudes de onda en esta región del espectro.

La aplicación de estas mediciones ha dado origen a algunos métodos de caracterización de las SH entre los cuales se utilizará la relación $E_4/E_6$, la cual es la relación entre la absorbancia medida a 465 y 665nm respectivamente, de una solución de ácidos húmicos o fúlvicos.

La interpretación de esta relación indica que valores bajos de la misma, implican un alto grado de aromaticidad, en tanto que valores altos indican un mayor contenido de cadenas alifáticas. Al respecto, Chen y otros (1977), señalaron que esta relación presenta una alta correlación con el contenido de radicales libres, O, C y COOH, la acidez total y el peso molecular del material. La tabla 4 ilustra valores obtenidos para distintos órdenes de suelos venezolanos.

**Tabla 4. Relaciones $E_4/E_6$ obtenidas para ácidos húmicos de suelos venezolanos**

| Referencia | Tipo de suelo | Uso | $E_4/E_6$ |
|---|---|---|---|
| Paolini, 1980 | Oxisol | Bosque amazónico mixto | 5,11 |
| Paolini, 1980 | Spodosol | Caatinga amazónica | 6,06 |
| Rodríguez, 1982 | Entisol | Moriche | 3,36 |
| Rivero, 1993 | Alfisol | Cultivo de maíz | 3,86 |
| Rivero, 1993 | Alfisol | Sabana | 5,53 |
| Rivero, 1993 | Inceptisol | Cultivo de maíz | 4,82 |
| Ruiz, 1995 | Ultisol | Sabana | 3,54 |
| Rivero et al., 1998a | Entisol | Sabana | 5,0 |
| Rivero et al., 1998a | Inceptisol | Cultivo de banano | 4,8 |

*Fuente: Rivero (2001)*

***Espectroscopía infrarrojo (IR):*** La presencia en las SH de grupos funcionales capaces de absorber radiación en el sector IR, ha convertido esta técnica en una valiosa herramienta para estudiar la naturaleza, reactividad y arreglo estructural de las mismas. Permite además, detectar la presencia o ausencia de proteínas y carbohidratos o de impurezas inorgánicas.

El análisis de los espectros IR fue usado por Stevenson y Goh (1971) para clasificar las sustancias húmicas en cinco grupos con base en el tipo de grupos funcionales detectados.

Es conveniente destacar que el infrarrojo con transformadas de Fourier es una técnica altamente efectiva desde el punto de vista cualitativo. Senesi (1992) plantea que la información obtenida por IR debe ser complementada por la aplicación de otras técnicas analíticas. En el país, Rivero y col (1998b) aplicaron esta técnica en suelos de Venezuela y encontraron espectros similares a aquellos señalados para suelos de otras regiones climáticas (Figura 3).

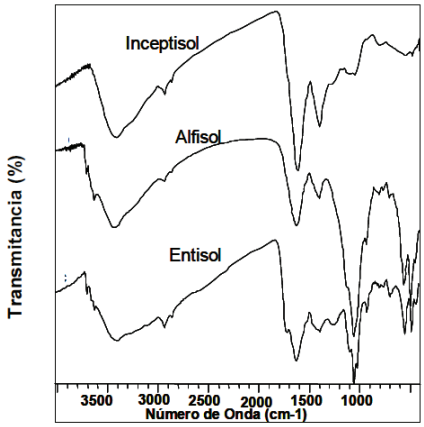



**Figura 3. Espectros IR-TF de tres órdenes de suelos venezolanos**

*Fuente: Rivero y col (1998b)*

# CAPITULO III

# MARCO METODOLÓGICO

## III.1. Muestras a emplear

Las muestras fueron proporcionadas por la empresa PROMIVECA. Provienen de Lobatera, Edo. Táchira. Previamente fueron trituradas y tamizadas a un tamaño de partícula de 1mm.

El lignito A es de color pardo oscuro y el lignito B es negro, su apariencia es la de un polvo suelto y fino.

## III.2. Análisis básico del material

El análisis próximo de carbón según norma ASTM D3172 se define como la determinación de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo.

- Humedad residual (ASTM D3173): Es la humedad que pierde un carbón seco al aire cuando se le somete a una temperatura de 104 a 110ºC.
- Materias Volátiles (ASTM 3175, ISO 562): Las materias volátiles son desprendimientos gaseosos de la materia orgánica durante el calentamiento exigido por la norma (950ºC durante 6min).
- Cenizas (ASTM D3174, ISO 1171): Las cenizas de un carbón son un producto de la combustión, es decir un residuo de la calcinación a 750ºC (ASTM) ó 815ºC (ISO) de minerales y sales existentes en el carbón.

- Carbono Fijo (ASTM D-3172): El carbono fijo representa el carbono que no es capaz de volatilizarse. Se obtiene por diferencia una vez conocidas la humedad, las cenizas y las materias volátiles.

Para obtener los porcentajes de análisis próximos se calculan de la siguiente manera:

- Humedad porcentual en la muestra de análisis (H)

$$H = [(A - B) /A] \times 100$$

en donde:

A= peso de la muestra usada, en g
B= peso de la muestra después del secado de humedad, en g.

- Materia volátil en la muestra de análisis (MV)

$$MV = [(B - C) /A] \times 100$$

en donde:
C= peso de la muestra después del calentamiento, en g.

- Cenizas en la muestra de análisis (CZ)

$$CZ = [(F - G) /A] \times 100$$

en donde:
F= peso del crisol y el residuo de ceniza, en g.
G= peso del crisol vacío, en g.

- Carbono fijo en la muestra de análisis (CF)

$$CF = 100 - (H + CZ + MV)$$

## III.3. Análisis elemental del material

### *III.3.1. Determinación del porcentaje total de Carbono en las muestras*

El carbono presente en las muestras de lignito se determinó mediante el método de Walkley y Black modificado (Walinga y col, 1992), el procedimiento fue el siguiente:

Se pesó por triplicado muestras de cada lignito, aproximadamente 0.02 g con precisión de 0.1mg, en una fiola de 25 mL. Se le añadieron 4 mL de una solución de Dicromato de Potasio ($K_2Cr_2O_7$) 2N y 4 mL de Ácido Sulfúrico concentrado ($H_2SO_4$). Se dejaron en reposo durante toda la noche y al día siguiente se trasfirieron cuantitativamente a un balón de 25 mL y se aforaron.

Las soluciones se centrifugaron por 10min a 3000 rpm en tubos de ensayo. Una vez culminada la centrifugación se transfirió cada sobrenadante a tubos de ensayo, y por último se medió a cada muestra la absorbancia a una longitud de 600nm utilizando un espectrofotómetro.

La curva de calibración se construyó a partir de soluciones patrón de glucosa con concentraciones de 0, 2.5, 5, 7.5 y 10 mg C/mL; partiendo de una solución madre de glucosa de 50mg de C/mL aproximadamente, en 100 mL de agua destilada, las soluciones patrón se realizaron en diluciones sucesivas. Se tomó 1mL de cada una de las soluciones patrón y se añadió

4mL de $K_2Cr_2O_7$ y 4 mL de $H_2SO_4$. Por último, se midió a cada patrón la absorbancia a una longitud de 600nm utilizando un espectrofotómetro.

### *III.3.2. Determinación del porcentaje de Nitrógeno*

Se utilizó el método de Kjeldahl el cual se basa en la transformación del nitrógeno contenido en la muestras mediante la digestión con ácido sulfúrico en presencia de un catalizador. El ion amonio obtenido se transforma, en medio básico, en amoníaco el cual es destilado y luego valorado con una solución de ácido bórico.

Se pesaron aproximadamente 0.2 g de muestra, con precisión de 0.1mg. Se introdujo cada muestra en los tubos digestores y se le agregó un cuarto de pastilla de catalizador. Luego se agregaron 5mL de una solución de peróxido de hidrógeno ($H_2O_2$) al 35% y 7mL de ácido sulfúrico ($H_2SO_4$), poco a poco. Usando una rampa de calentamiento se mantienen los tubos a 420ºC durante 30min en un bloque digestor (ver figura 4).

Para realizar la destilación se adicionaron 25 mL de agua destilada y 25 mL de una solución de NaOH al 30% en un tubo; de inmediato se colocó en el destilador y en una fiola se agregaron 25 mL de una solución de ácido Bórico al 4%. Se realizó la destilación hasta que el volumen en la fiola alcanzó unos 100 mL. Se procedío a titular con HCl estandarizado al 0.1M, se utilizó como indicador Tashiro (rojo de metilo-azul de metilo).

Se efectuó una prueba en blanco, utilizando 5 mL de agua en vez de la muestra, siguiendo todo el procedimiento de titulación descrito.

*El Porcentaje de nitrógeno total se calculó de la siguiente manera:*

$$\%N_{TOTAL} = \frac{(v_1 - v_2) \cdot A \cdot 1{,}4007}{D}$$

Donde: $v_1$ = volumen HCl gastado en muestra

$v_2$ = volumen HCl gastado en blanco

A = concentración del titulante (HCl)

D = masa en gramos de la muestra

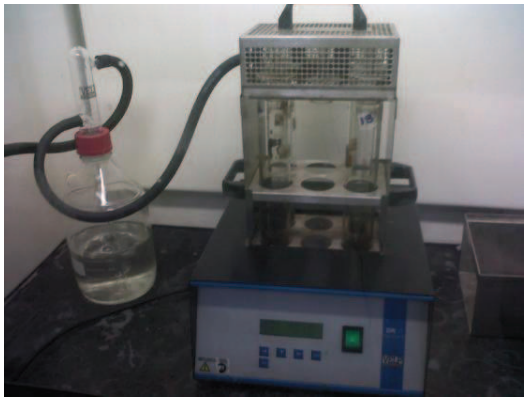


**Figura 4. Bloque digestor DK 6 VELP SCIENTIFIC**

(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011)

## III.4. Análisis Molecular

### *III.4.1. Extracción y fraccionamiento de las sustancias húmicas*

La extracción y el fraccionamiento químico de las sustancias húmicas se realizó por medio del procedimiento descrito por Ciavatta (1991), como se muestra a continuación:

Se pesó por triplicado 2.5g de cada tipo de lignito, con precisión de 0.1mg. Cada muestra se diluyó en 50mL de una solución de NaOH 0.1M. Se dejaron en agitación por un día (ver figura 5) y luego se centrifugaron durante 20min a 5000rpm (ver figura 6).

**Figura 5. Agitador orbital AO-400 BUNSEN**

(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011).

**Figura 6. Centrifugación de las muestras.** Equipo centrifuga Orto Aldesa Modelo Digitor (izquierda); rotor y porta tubos donde se realiza la centrifugación (derecha).

(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011)

El sobrenadante formado se filtró, para luego ser transferido cuantitativamente en balones aforados de 50mL. Dichas muestras se filtraron al vacío con un filtro microporoso de 0.2µm. Del filtrado resultante se tomaron alícuotas de 25mL y se transfirieron a tubos centrifuga. Mediante la adición de $H_2SO_4$ al 50 %, se llevó a pH 2 aproximadamente para luego centrifugar a 5000rpm por 20min. El sobrenadante el cual estaba formado por una mezcla AF y SNH, se separó y almacenó en frascos con tapa bajo refrigeración, para su posterior uso. El precipitado correspondió a la fracción de AH y se diluyó en balones aforados de 100mL, con NaOH al 0.01M.

La solución de AF y SNH se pasó por una columna de Polivinilpirrolidona (PVP) previamente empacada con $H_2SO_4$ 0.01M (ver figura 7). La fracción que no quedó retenida en la columna correspondió a la fracción de material no humificado, es decir, las SNH. Esta fracción se arrastró completamente con una solución 0.01M de $H_2SO_4$, se recogió en un balón de 50 mL y se aforó. La fracción retenida (AF) en la columna de PVP, se recuperó haciendo pasar por la columna una solución 0.5 M de NaOH; se recogió en un balón de 50mL y se aforó.

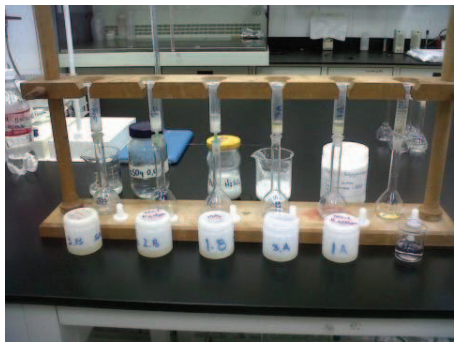
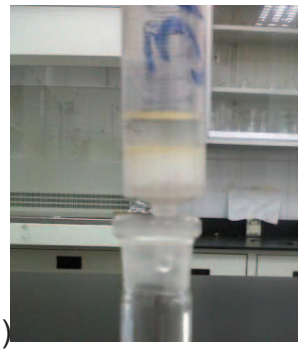
a)  b) 

**Figura 7. Separación de ácidos fúlvicos y sustancias no húmicas con una columna de PVP.** a) Columnas de PVP de todas las muestras, b) Acercamiento de una columna de PVP.

(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011)

Las fracciones de AH se colocaron en una membrana de diálisis, durante 7 días, cambiando el agua diariamente. Se revisó si el agua de lavado ya no contenía sales agregando a porciones del agua, soluciones de $AgNO_3$ 0.1M y $BaCl_2$ para determinar cloruros y sulfatos respectivamente.

Luego de realizar la diálisis de los AH se secaron en un liofilizador (ver figura 8). Las muestras fueron previamente congeladas y posteriormente se realizó la deshidratación al vacío. En este proceso se mantienen solidificadas las muestras durante todo el secado y no ocurre la evaporación del agua a partir del estado líquido, sino la sublimación del hielo, obteniéndose como resultado muestras secas con todas sus características originales (forma, color, aroma, etc).

**Figura 8. Equipo liofilizador marca Telstar Modelo Cryodos**

(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011)

### *III.4.2. Determinación del porcentaje de carbono en cada fracción*

Se determinó el carbono orgánico utilizando el método de Walkley y Black modificado, descrito en III.3.1. Se tomaron alícuotas de 1 a 5mL dependiendo del contenido de carbono orgánico total de la muestra, se llevaron a sequedad, sometiendo las muestras a una temperatura no mayor de 40ºC y se agregaron 4mL de $K_2Cr_2O_7$ y 4mL de $H_2SO_4$ para realizar la oxidación de las muestras (Walinga y col, 1992).

### *III.4.3. Determinación del número de neutralización en los ácidos húmicos*

El número de neutralización se obtuvo utilizando la metodología descrita por Ritchie y Perdue (2003).

Se pesaron aproximadamente 9 mg de AH con una precisión de 0.1mg, se disolvieron en una solución de NaOH 0.002M (previamente valorada), el cual se neutralizó con HCl 0.5M antes de la titulación. Esta solución se tituló potenciométricamente con una solución de NaOH (0.1010M) previamente valorada.

El número de neutralización del ácido se calculó de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$NN = \frac{Vt \times M}{PM}$$

Donde: NN= moles de neutralización
PM= peso de la muestra
Vt= volumen de titulante
M=Molaridad

### *III.4.4. Determinación del porcentaje de carbohidratos presentes en las muestras de lignitos*

Los carbohidratos totales presentes en los lignitos se determinaron por el Método de Safarik y Santruckova (1992). Se procedió a realizar la hidrólisis de las muestras siguiendo la siguiente metodología:

Se pesaron aproximadamente 25mg de cada muestra por triplicado, se le adicionó 0.1mL de $H_2SO_4$ concentrado. Se dejó en reposo 16h a temperatura ambiente, luego se le adicionó 2.4mL de agua destilada y se colocó en un baño de agua hirviendo durante 8h.

Una vez hidrolizadas las muestras se tomaron 0.5mL, se mezclaron con 0.5mL de agua destilada y 1mL de solución de fenol al 5%, inmediatamente se le agregaron 5mL de $H_2SO_4$ concentrado y se mezcló. Se agitó por 10s y se dejó reposar 1h a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia de las muestras a 485nm. El blanco para calibrar el equipo fue agua y $H_2SO_4$ sin la solución de fenol.

## *III.5. Análisis Estructural*

Una vez realizado el fraccionamiento de la materia orgánica presente en las muestras y luego de analizar la composición de cada fracción, se procedió a medir los espectros utilizando espectroscopía de UV-visible. Estos análisis solo fueron realizados a los AH.

### *III.5.1. Espectroscopía UV-visible*

**Espectros:** Los espectros fueron obtenidos utilizando un espectrofotómetro de doble haz (ver figura 9), con una celda de 1cm, las muestras fueron disueltas en una solución de $NaHCO_3$ amortiguado a pH 8.

**Figura 9. Espectrofotómetro de doble haz marca LAMBDA**
(Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas Facyt-UC 2011)

***Determinación de la relación E4/E6:*** Esta relación se obtuvo midiendo la absorbancia de las soluciones de ácidos húmicos en $NaHCO_3$ amortiguado a pH 8; a 465 y 665nm (Kononova, 1966).

### *III.5.2 Espectroscopía IR*

Los espectros IR fueron realizados en el Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación (LABSAI) del Departamento de Química de la FACYT, UC.

## III.6 Parámetros en los lignitos para su posible uso en el mejoramiento de suelos agrícolas

### *III.6.1. Capacidad de intercambio catiónico (CIC)*

Se realizó por el método del acetato de amonio normal y neutro (Schollenberger y Simon, 1945). Se pesó aproximadamente 5.0 g de cada lignito, con precisión de 0.1mg. Se adicionó 25 mL de acetato de amonio y se

agitó durante 30 min. Luego de dejar reposar por 15min se centrifugó a 5000rpm por 15min. Luego se filtró y lavó con etanol. Se dejó en contacto toda una noche con NaCl al 10%, se filtró y posteriormente se tituló el extracto obtenido con NaOH (estandarizado), usando fenolftaleína como indicador (Tan, 1996). Cada extracción se realizó por triplicado.

### *III.6.2. Actividad Microbiológica*

Se determinó la actividad microbiológica por el método de incubaciones estáticas (Stotzky, 1965). Este consiste en la determinación de la medida del desprendimiento de $CO_2$ por la actividad de los microorganismos presentes (en este caso en el lignito) durante un período de tiempo, en condiciones controladas de humedad y temperatura en el laboratorio, siguiendo el procedimiento descrito por Anderson (1982).

Las muestras de lignito fueron rehumedecidas adicionando agua destilada, se colocaron tres réplicas de 50 g aproximadamente de cada muestra en frascos con tapa hermética (previamente esterilizados), estas se dejaron reposar por un día. Al siguiente día se introdujo un vial con 25 mL de NaOH 0,1 M. Los frascos previamente cerrados se colocaron en oscuridad a temperatura de laboratorio. Los viales se cambiaron a los 7, 12, 19, 24, y 34 días. Como blanco se utilizó un frasco que solo contenía el vial con NaOH. El $CO_2$ desprendido se midió indirectamente por medio de la titulación del exceso de NaOH con HCl 0,1 M, precipitando los carbonatos con cloruro de bario ($BaCl_2$) 0,05 M y se usó fenolftaleína como indicador.

# CAPITULO IV
# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## IV. 1. Caracterización fisicoquímica de los lignitos

La caracterización de las muestras se inició con los análisis básicos del Lignito A y B, los cuales constan de la determinación de humedad, cenizas, materia volátil y carbono fijo, presentes en las muestras. Los resultados se muestran en la tabla 5 donde se pueden comparar las diferencias que existen entre el lignito A y el lignito B.

Ramos (2003) publicó un estudio que realizó con 10 tipos de lignitos comerciales de diferente origen y procedencia reportando intervalos de humedad de 14-35 %. Se observa que la humedad del lignito A (15,8%) se encuentra dentro de este intervalo. Por otro lado, el lignito B presentó un porcentaje de humedad (9,8%) fuera de ese intervalo, lo que indica que pudiera ser un lignito de un origen de formación diferente al Lignito A (aunque sean del mismo lugar de procedencia) y a los estudiados por Ramos, en su caso pudieron haber intervenido menores cantidades de agua en la formación de los mismo.

Las cenizas son un producto de la combustión, es decir un residuo de la calcinación de minerales y sales existentes en el lignito según *American Section of the International Association for Testing Materials* (ASTM). El A contiene mayor cantidad de cenizas que él B, esto nos indica que contendrá una cantidad mayor de materia inorgánica disponible que puede ser importante para la nutrición de las plantas.

El siguiente parámetro estudiado fue la materia volátil. Este porcentaje representa el desprendimiento gaseoso de la materia orgánica durante el calentamiento (ASTM). El Lignito A contiene mayor porcentaje que el lignito B, esto indica que el A debe contener mayor cantidad de materia orgánica y por ello presenta mayor cantidad de materia volátil.

Por último, para los análisis básicos del material se calculó el carbono fijo, este representa la parte que no es volátil. Es de esperarse que este porcentaje sea mayor para B ya que en los porcentajes de cenizas y materia volátil resultaron menores en este lignito.

En general, puede decirse que los análisis básicos del lignito nos dan información acerca de la cantidad de materia orgánica, inorgánica y humedad que contiene el material en estudio y nos demuestra que los lignitos estudiados a pesar de proceder del mismo lugar, probablemente el material parental de origen fue diferente para ambos.

**Tabla 5. Resultados obtenidos en los análisis básicos**

| Análisis | Lignito A (%) | Lignito B (%) | Método ASTM |
|---|---|---|---|
| Humedad Residual | 15.8±0.2 | 9.8±0.1 | D 3173-02 |
| Cenizas* | 22.2±0.1 | 16.7±0.1 | D 3174-04 |
| Materia Volátil* | 23.8±0.1 | 20.8±0.1 | D 3175-04 |
| Carbono Fijo* | 54.0±0.1 | 62.6±0.1 | D 3172-02 |

*Reportado en base seca

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

Como análisis elemental del material se propuso determinar la cantidad de Carbono y Nitrógeno contenido en las muestras. En los resultados del porcentaje de carbono orgánico total (Walinga y col, 1992), se observó que el Lignito A contiene un valor de (47±1) % el cual es mayor al que presenta el Lignito B, siendo este de (38±2) %. Estos resultados muestran que A contiene mayor cantidad de materia orgánica (MO) disponible (ver tabla 6).

Según la Fundación Americana de Carbón (ACF, 2005) el porcentaje de carbono en los lignitos se encuentra entre un 25-35%, sin embargo los lignitos estudiados están por encima del intervalo mencionado. Esto podría representar una ventaja debido a que al proporcionar una mayor cantidad de MO, se optimiza la estructura y permeabilidad de un suelo y aumenta el desarrollo vegetal del mismo (Varanini y Pinton, 1995).

Para determinar el contenido de Nitrógeno en las muestras se utilizó el Método de Kjeldahl, lo cual se realizó en repetidas ocasiones sin lograr la detección de nitrógeno presente, debido posiblemente a la poca eficiencia del equipo utilizado, el cual no es lo suficientemente sensible para detectar pequeñas cantidades de nitrógeno.

Para corroborar los resultados, se enviaron muestras al Laboratorio de Carbón y Coque del INZIT, los cuales reportaron valores menores al 1% de N, evidenciándose que la cantidad presente en las muestras es bastante baja (ver tabla 6); estos valores son más altos que los indicados para distintos tipos de lignitos (0,08- 0,26 % N) (Ramos, 2003). En general, la baja cantidad de Nitrógeno se debe a que el proceso de humificación natural que sufren los lignitos hace descender la concentración de N en su seno (Varanini y Pinton, 1995).

**Tabla 6. Resultados obtenidos en los análisis elementales**

| Análisis | Lignito A (%) | Lignito B (%) | Método |
|---|---|---|---|
| Carbono | 47±1 | 38±2 | Walkley y Black modificado |
| Materia Orgánica | 82±1 | 65±1 | Walkley y Black modificado |
| Nitrógeno | 0.93 | 0.93 | D 5373-02 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

Para el análisis molecular de las muestras se realizó el fraccionamiento de la materia orgánica (MO) (Ciavatta, 1991) se determinó el porcentaje de carbohidratos totales (Safarik y Santruckova, 1992) y se determinó el número de neutralización de las muestras (Ritchie y Perdue, 2003).

Tras realizar el fraccionamiento de la MO se pudo calcular el porcentaje de carbono en cada fracción (SH, AH, AF y SNH) y luego calcular el porcentaje que representa cada una de ellas en la muestra (ver tabla 7). Se observa que ambos lignitos están formados fundamentalmente por AH, presentando niveles muy bajos de la fracción fúlvica y la no húmica.

El alto porcentaje de AH obtenido en los lignitos representa una ventaja de gran importancia para usos agrícolas, debido a que los AH son quienes cumplen las principales funciones, como lo es el aumento de la CIC y de la actividad microbiológica, entre otras; que hacen del lignito un

excelente aditivo para mejorar las características de suelos haciéndolos útiles para cultivos.

Al comparar el porcentaje se SH con la suma de los porcentajes de AH, AF y SNH se observa que estos son bastantes cercanos, lo que podría ser consecuencia del uso de un método de extracción reproducible y preciso.

El fraccionamiento realizado por Ramos (2003) presentó valores que pueden ser observados en la tabla 8, estos intervalos se encuentran por debajo de los porcentajes presentes para las SH y AH (ver tabla 7), sólo los AF se encuentra dentro del intervalo. Sin embargo, esto nos indica es que los lignitos de este estudio son más abundantes en AH que los lignitos estudiados por dicho autor, es decir, los lignitos evaluados en este trabajo presentan características más beneficiosas para el mejoramiento de suelos que los lignitos comerciales que Ramos evaluó.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Franco y col. (1998) y Stevenson (1994), donde se explica que en materiales muy evolucionados como los lignitos, predominan ácidos húmicos con estructuras aromáticas altamente condensadas, de elevados pesos moleculares y prácticamente sin presencia de sustancias no húmicas como proteínas y mucopolisacáridos.

Por otro lado se determinó el contenido de carbohidratos totales en las muestras siendo para el Lignito A (1.5±0.3) % y para el B (1.7±0.3) %. La diferencia entre los porcentajes de carbohidratos observados no es significativa lo que nos indica que ambos lignitos contiene cantidades similares de carbohidratos.

**Tabla 7. Porcentajes obtenidos en el fraccionamiento de la materia orgánica**

| Lignito | %SH | %AH | %AF | %SNH | Sumatoria % | Método |
|---|---|---|---|---|---|---|
| A | 33±1 | 30±2 | 1.7±0.1 | 0.9±0.1 | 32.6 | Walkley y Black modificado |
| B | 29±2 | 28±1 | 1.3±0.1 | 0.5±0.1 | 29.8 | |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 8. Porcentajes reportados en el fraccionamiento de la materia orgánica de lignitos comerciales**

| Lignito | %SH | %AH | %AF |
|---|---|---|---|
| Intervalos observados en 10 tipos de lignitos comerciales | 11-22.8 | 8.6-20.7 | 0.7-5.9 |

*Fuente: (Ramos, 2003)*

Por último en el análisis molecular se realizó la determinación del número de neutralización de los AH. Se utilizó la metodología descrita por Ritchie y Perdue (2003), donde se llevó a cabo una titulación potenciométrica de una solución de AH en NaOH neutralizado con HCl y se calculó la acidez aportada por el contenido de grupos carboxílicos (pH 8) y el contenido de grupos fenólicos (pH entre 8 y 10). Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 9 los cuales se encuentran entre los intervalos reportados en dicha investigación, para ácidos húmicos de diferentes procedencias.

Es importante realizar la evaluación de las propiedades ácido-base de las sustancias húmicas, en este caso de los AH, debido a que influyen en el balance del pH de los suelos.

En el caso de los suelos ácidos, los ácidos húmicos promueven la neutralización de los mismos, este aumento en el pH reduce el daño que causa el ácido en las raíces, también promueve la inmovilización de elementos nocivos para las plantas, particularmente el aluminio y los metales pesados. De esta manera la toxicidad existente en los suelo se reduce (Humitech, 2005).

En los suelos alcalinos muchos elementos nutritivos vitales y muchos oligoelementos no están a disposición de las plantas. Por la formación de complejos, los ácidos húmicos amortiguan el alto pH y convierten estos elementos en formas disponibles para las plantas (Humitech, 2005).

**Tabla 9. Números de neutralización calculados para las muestras e intervalos de acidez reportados**

| Lignito | Nº de neutralización para -COOH (mmol/g) | Nº de neutralización para -OH (mmol/g) |
|---|---|---|
| A* | 7.10±0.02 | 3.30±0.03 |
| B* | 7.50±0.04 | 3.30±0.02 |
| Ritchie y Perdue (2003) | 7.1-15.2 | 1.8-4.2 |

* *Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

## IV. 2.- Determinación de parámetros en los lignitos para su posible uso en el mejoramiento de suelos agrícolas

Para estudiar el posible uso del lignito en el mejoramiento de suelos se evaluaron dos parámetros, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) y la actividad microbiológica (mediante la determinación de la respiración basal). Los resultados obtenidos para estos parámetros se observan en la tabla 10.

**Tabla 10. Parámetros calculados para la evaluación del uso de lignitos en el mejoramiento de suelos**

| Parámetro | Lignito A | Lignito B |
|---|---|---|
| Capacidad de intercambio catiónico (CIC) (cmol/kg lignito) | 51±2 | 35±2 |
| Respiración Basal ($mgCO_2$/Kg lignito*Días totales) | 3±1 | 2.9±0.4 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

La CIC puede depender en más de un 80% de la MO presente (Stevenson, 1994) y como se puede observar en la tabla 8 la CIC del Lignito A es mayor en comparación con el Lignito B, concordando con los porcentajes de MO reportados en la tabla 6 donde él % de MO en A es mayor que en B.

Está reportado que el intervalo de CIC óptimo que debe poseer un suelo de usos agrícolas está entre 25 y 35 cmol/kg suelo (García, 2005); lo que nos indica que la CIC de los lignitos estudiados es alta. Se puede decir

que estos resultados son correctos debido a que los AH poseen un elevado peso molecular (Gallardo, 1994), que dan lugar a una CIC elevada. El uso de los AH en suelos arenosos con muy poco humus, representaría beneficios para este, incrementando la CIC y la capacidad de retención de humedad y de elementos nutritivos (Humitech, 2005).

Por otra parte, la actividad microbiológica de los lignitos en estudio se determinó mediante la medida del desprendimiento de $CO_2$ por la actividad de los microorganismos presentes en la muestras. Se determinó la respiración basal durante un periodo de incubación de 34 días (ver tabla 9).

Los resultados nos indican que entre ambos lignitos no hay diferencias significativas en su respiración basal. Estos resultados podrían considerarse bajos comparados con la respiración indicada en suelos agrícolas venezolanos (13.68-98.64mg $CO_2$/kg suelo*días totales) (Sánchez y col, 2005). La respiración basal baja es un indicativo de un material con un alto grado de madurez como el que presentan los lignitos.

La importancia de los microorganismos del suelo se debe que aparte de suministrarle una buena cantidad de biomasa al mismo, intervienen activa y directamente en ciclos geoquímicos como el del C, el del N, el del P y el del S (Jaramillo, 2002). Además, la adición de SH a los suelos como fuente de carbono puede ser utilizada para incrementar la población microbiana y por tanto la actividad enzimática asociada (Lizarazo, 2001).

Por estas razones un lignito no debe contener una alta actividad microbiana, la gran cantidad de materia orgánica que contienen, será el factor importante para que al ser adicionados incrementen la actividad de los microorganismos que el suelo contenga, posiblemente en un estado de latencia.

Si observamos las figuras 10 y 11, vemos como la actividad microbiológica (medida como los mg de $CO_2$ desprendidos por día) fue aumentando al pasar los días lo que nos demuestra que sí existe la activación de los microorganismos presentes en el lignito, existiendo la posibilidad de que estos puedan intervenir en el mejoramiento de suelos.

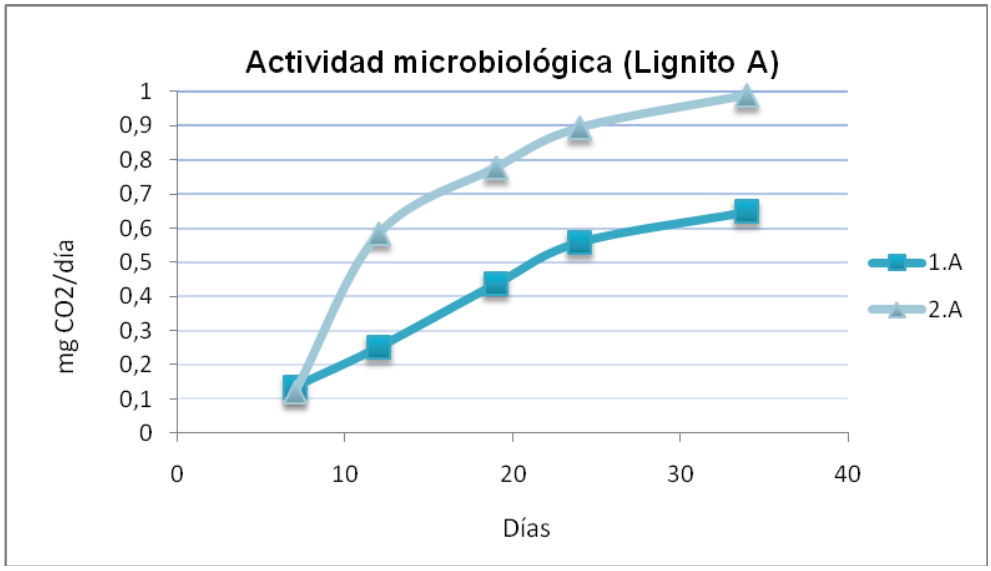



**Figura 10. Determinación de la actividad microbiológica en el Lignito A**

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

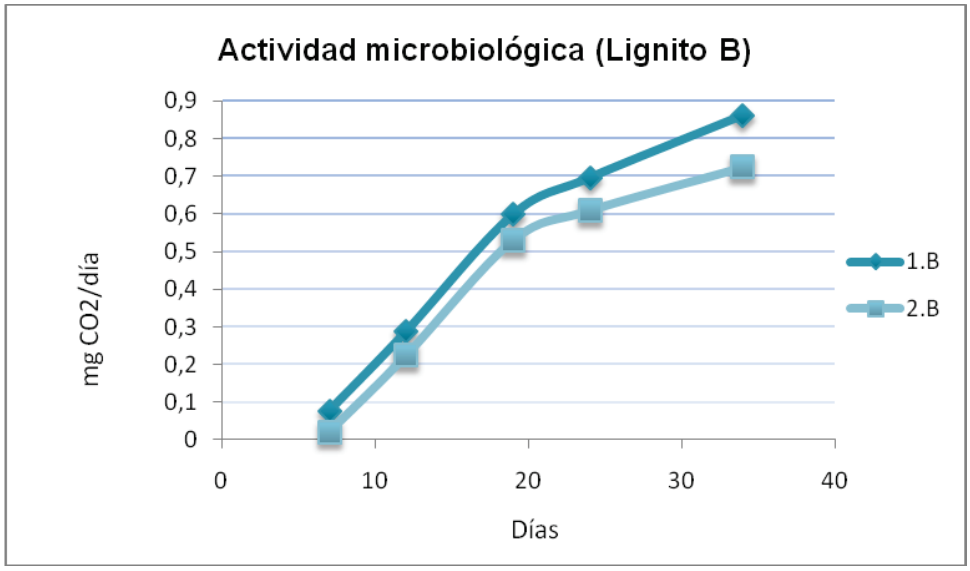



**Figura 11. Determinación de la actividad microbiológica en el Lignito B**

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

En general, se puede decir que el uso del lignito (específicamente, el lignito A) como aditivo en el mejoramiento de suelos, aumentará su capacidad de retención de agua, evitará la retención de los cationes del suelo disminuyendo su fijación, mejorara su estructura y activará la flora microbiana, considerándose así como una excelente opción para mejorar un suelo que posteriormente podrá ser cultivado y se obtendrán mejores cosechas.

Otro ventaja que presentaría el uso especifico del lignito es su gran cantidad de AH y su baja cantidad de AF que por ser un material joven y poco humificado en el predominan las estructuras alifáticas que, si bien son altamente hidrofílicas y muy activas en cuanto a su interacción con los micronutrientes y su movilidad, tienen un tiempo de residencia en el suelo muy corto, debido a su rápida biodegradación por microorganismos; por el contrario, los AH, son procedentes de materiales más carbonizados, con

estructuras aromáticas policondensadas y pesos moleculares mayores, con ausencia de proteínas y mucopolisacáridos (Franco y col, 1998), que cumplirán las funciones anteriormente nombradas, teniendo un tiempo de residencia en el suelo mayor que los fúlvicos.

### IV. 3. Caracterización espectroscópica

La caracterización espectroscópica fue realizada solo a los AH, debido a que los AF se encuentran en el lignito en un bajo porcentaje (1.5%), lo que hace difícil el aislamiento y purificación de los mismos.

Los AH fueron previamente dializados en una membrana para eliminar las sales presentes y luego fueron liofilizados para obtenerlos en estado sólido (Rivero y col, 1998a).

Se evaluó su comportamiento en tres solventes (hexano, diclorometano y metanol) pero en ninguno de los tres casos fue soluble, debido a este comportamiento no se realizaron los espectros UV-visible en dichos solventes, solo fueron obtenidos en solución de bicarbonato de sodio.

La banda de absorción de radiación observada en los espectros puede ser indicativo de la presencia de anillos aromáticos, dobles enlaces u orbitales electrónicos deslocalizados, que poseen bajas energías de excitación y se encuentran en las moléculas que conforman los AH (Rivero, 2001). Al comparar los triplicados de cada tipo de lignito se pudo constatar que la tendencia de las curvas espectrales es similar (ver figura 12 y 13).

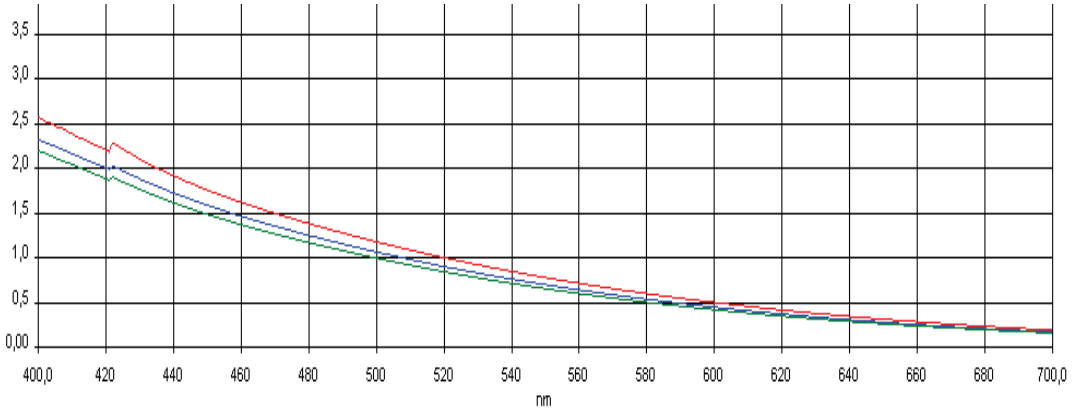



**Figura 12. Espectros UV-visible del Lignito A**

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

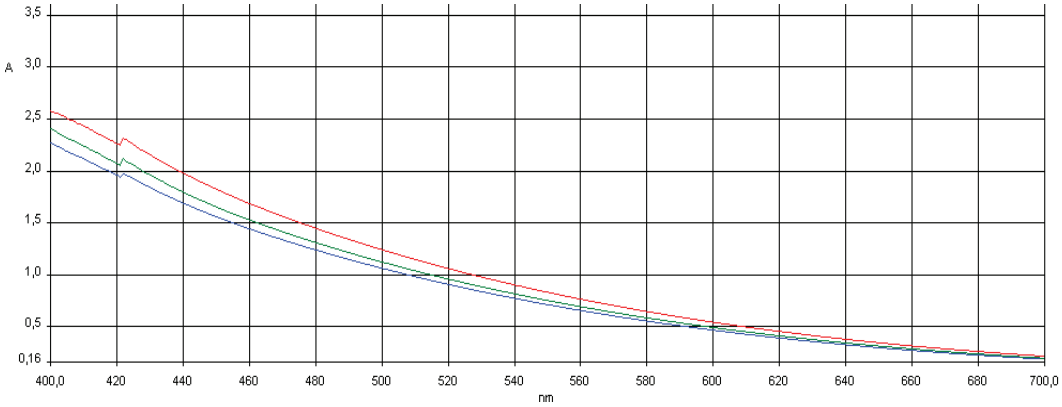



**Figura 13. Espectros UV-visible del Lignito B**

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

La relación óptica $E_4/E_6$ se determinó midiendo la absorbancia de dichas soluciones de AH a una longitud de 465nm y 665nm (Kononova, 1966). Como resultados se obtuvo una relación de 5.7±0.1 para el lignito A y 5.8±0.2 para el lignito B; valores que se encuentran cercanos, pero superiores al intervalo de 4-5.3% reportado para otros lignitos estudiados, (Ramos, 2003).

Es importante señalar que dicha relación sirve como índice de humificación, es decir, como medida de los tamaños y condensación molecular. Según Stevenson (1994) valores de $E_4/E_6$<5.0 corresponden a AH, y entre 6-8.5 a AF. De esta manera, se puede decir que la relación $E_4/E_6$ desciende conforme aumenta el peso molecular y el grado de humificación del material correspondiente. Así, los materiales más evolucionados, y por tanto más condensados y con mayor carácter aromático, tendrán valores de esta relación óptica más pequeños.

En el caso de los lignitos estudiados se observó que las relaciones para ambos son un poco más altas en comparación con los valores reportados para AH provenientes de lignitos, esto nos indica que presentan un grado de aromaticidad y peso molecular no tan elevados como los reportados habitualmente para AH.

Por otra parte, para la obtención y análisis de los espectros IR de los AH se proporcionaron muestras al Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigación (LABSAI) del Departamento de Química de la FACYT, UC. Al compararlos con espectros de AH de otras publicaciones (Rivero y col, 1999; Agarwal y col, 2010), puede observarse que es notoria la diferencia en los espectros obtenidos para los lignitos estudiados, la cual presentan una gran cantidad de picos que no poseen una buena resolución, ese comportamiento puede deberse a una gran cantidad de muestra en las pastillas usadas para realizar los espectros, ya que la absorbancia mostrada es muy elevada. Sin embargo, se puede notar picos en longitudes cercanas a 3400, 1725 y 1630 $cm^{-1}$ que pueden ser atribuidas al enlace de hidrogeno del grupo –OH, estiramiento del C=O de los grupos COOH y a los dobles enlaces de C=C, respectivamente.

Bandas en la región de 2925, 1400 y 1050 cm-1, que puede ser

atribuidas a la vibración de flexión de los grupos alifáticos C-H, el vibraciones de flexión O-H de los alcoholes o ácidos carboxílicos y la deformación de flexión OH de los grupos carboxilo, respectivamente (datos extraídos de Agarwal y col, 2010). Los espectros analizados pueden ser observados en la figuras 18 y 19, en el apéndice.

# CAPÍTULO V

# CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

## V.1. Conclusiones

- ✓ El Lignito A presenta mayores porcentajes de humedad, cenizas y materia volátil que el Lignito B esto refleja que estos parámetros variaran dependiendo del tipo de lignito que se estudie y que a pesar de que los lignitos estudiados procedían del mismo lugar, probablemente el material parental de origen fue diferente para ambos.

- ✓ El Lignito A contiene mayor materia orgánica que él B debido a que presenta mayor porcentaje de carbono orgánico lo que hace del A una mejor opción para el uso de este como enmienda orgánica en el suelo.

- ✓ El método de extracción empleado con hidróxido de sodio permitió separar la materia orgánica en diferentes fracciones (AH, AF y SNH) presentes en los lignitos estudiados.

- ✓ El porcentaje de carbohidratos no varía significativamente en los dos tipos de lignito estudiados.

- ✓ Los lignitos estudiados son aptos para ser empleados con fines agrícolas. tomando en consideración que la capacidad de intercambio catiónico para el lignito A es superior a los valores óptimos reportados para suelos agrícolas, mientras que los valores para el lignito B se encuentran en el límite superior del valor reportado en las referencias bibliográficas.

- ✓ La respiración basal de ambos lignitos es baja hecho que se observa en materiales con alto grado de madures, la gran cantidad de MO incrementará la población microbiana existente en el suelo.

- ✓ El empleo de la técnica espectroscópica UV-visible no generó aportes significativos al análisis estructural.

- ✓ La relación óptica $E_4/E_6$ obtenida es un poco alta comparada con las relaciones que presentan algunos lignitos, lo que quiere decir que estos AH tienen menor carácter aromático comparado con otros AH.

- ✓ La espectroscopia IR es una técnica viable para la confirmación de grupos funcionales presentes en la estructura de las moléculas de ácidos húmicos tales como los grupos OH y COOH.

## V.2. Recomendaciones

- Para comprobar el efecto de los AH en el mejoramiento de suelos se recomienda aplicarlos en algunos suelos (caracterizados) y comparar si hubo algún cambio en sus características.

- Es recomendable realizar nuevamente la determinación de la actividad microbiológica con muestras de lignitos frescas, para comparar si existe alguna diferencia con los resultados obtenidos en esta investigación.

- Se podría realizar una extracción con una mezcla de NaOH y Pirofosfato de sodio para observar si con la mezcla de reactivos se obtiene mayor porcentaje de sustancias extraíbles, que usando solo el NaOH.

- La caracterización espectroscópica podría complementarse utilizando las técnicas de RMN y espectrometría de masas, las cuales no se realizaron por no poseer los equipos necesarios.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS


- ACF (2005). American Coal Foundation. Extraído el 12 mayo del 2011 desde http://www.ket.org/trips/coal/agsmm/agsmmtypes.html

- Agarwal, S.; Khalid, M.; Khanna, R.; Ali, A. y Sultana, Y. (2010). Humic acid from Shilajit – a physico-chemical and spectroscopic characterization. J. Serb. Chem. Soc. 75 (3) 413-422.

- Anderson, J. P. (1982). Soil respiration. p. 831-871. En: Methods of soil analysis. Part 2. Chemical and microbiological properties. 2nd ed. (A.L. Page, R H. Miller and D.R. Keeney eds.) Soil Science Society of America Number 9. SSSA, Madison, Wisconsin, USA.

- ASTM. Análisis Próximos. Laboratorio del Centro de Investigaciones del Carbón. Universidad Nacional de Colombia**.** Extraído el 22 de marzo desde: http://www.unalmed.edu.co/~ctcarbon/analisis_proximos.htm

- Aguilar, M. (2008). Introducción a Fluidos de Perforación. Universidad Nacional de Salta.

- Broadbent, F. (1965). Organic matter, *En*: Methods of Soil Analysis. Part. 2. *Amer. Soc. of Agron*, 9: 1397-1400.

- Burbano, H. (1989). El Suelo: Una visión sobre sus componentes biorgánicos. Universidad de Nariño. Pasto. p. 447.

- Chen, M., Senesi, M. y Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4:E6 ratios. Soil Sci. Soc. Am. J. 41:3-53-357.

- Cheung, P y otros. (2002). Imágenes claras en lodos base aceite. *Oilfield Review. Schlumberger.* Extraído el 7 de septiembre del 2010 desde

http://www.slb.com/resources/publications/industry_articles/oilfield_review/2002/or2002_sp_spr01_lodosbaseaceite.aspx

- Ciavatta, C.; Antisari, L. y Sequi, P. (1991). Humification Parameters of Organic Materials Applied to soil. Lectures notes in Earth Sciences. Springer Velarg, Berlin. P.p. 177-185.

- Franco, J. y Bañón, S. (1998). Posibilidades agrícolas de los ácidos húmicos comerciales. Horticultura, 69.

- Gallardo, J. (1994). Introducción a la química de las sustancias húmicas, el humus, la materia superficial del suelo, regulación y nutrición de los suelos. Ministerio de agricultura y pesca. *Investigación y ciencias*, 46: 8-16 España.

- García, N., A. (2005). Edafologia. Ciencias A,bientales. Extraído el 28 de abril: http://www1.unex.es/eweb/edafo/ECAP/ECAL5PFQReaccion.htm

- Garreaud y otros (2004). Modernización e Integración Transversal de la Enseñanza de Pregrado en Ciencias de la Tierra. Universidad de Chile. Extraído el 10 de octubre del 2010 desde la pagina web: http://mct.dgf.uchile.cl/AREAS/mine_mod230.pdf

- GEA (2000). Gran Enciclopedia Aragonesa. Lignito. Extraído el 07 de septiembre de 2010 a las 6:40pm desde http://www.enciclopedia-aragonesa.com/voz.asp?voz_id=8002

- Humitech (2005). Extraído el 07 de septiembre del 2010 a las 5:00pm desde http://www.humintech.com/pdf/imagebrochure.01.034.pdf

- Kononova, M. (1966). Materia Orgánica de los suelos, su naturaleza, su papel en la formación del suelo y en la fertilidad. 2da Edición. London Pergamon Press.

- Kumada, K. (1987). Chemistry of soil organic matter. Japan Scientific Societies Press. Elsevier. Tokio. p. 241.

- Lesser, M (1995). Prospección de contaminación de suelos por hidrocarburos. Geólogos. México. 1(6):5-8.

- Li, L.; Zhenye, Z.; Weilin, H.; Peng, P.; Guoying, S. y Jiamo, F. (2004). Characterization of humic acids fractionated by ultrafiltration Organic Geochemistry 35 1025–1037. www.elsevier.com/locate/orggeochem

- Lizarazo, L (2001). Incidencias de sustancias húmicas comerciales sobre microorganismos en el suelo. Universidad de Alicante.

- Osorio, R. (2009). Aditivos de lignito en fluidos de perforación. Extraído el 07 de septiembre del 2010 a las 6:40pm. http://www.petroblogger.com/2010/02/aditivos-de-lignito-en-fluidos-de.htmL

- Pakulski y Benner (1992). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. p. 66-68.

- Paul y Clark (1989). Soil microbiology and biochemistry. Academic Press Inc. Londres. p. 275

- Popov, A. I. (2008). The problable mechanism of biological effect of humic substances. *In:* Perminova y Kulikova (eds). From Molecular understand to Innative Aplications of Humic Substances. International Humic Substances Society. Humus Sapiens Moscow. pp. 453-456

- Ramos, R. (2000). Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulantes. Efectos frente al estrés salino. Tesis doctoral. Universidad de Alicante. España.

- Rivero, C., Senesi N., Paolini J. y D´Orazio V. (1998a). Characteristic of soil humic acid of some Venezuelan soils. Geoderma 81:227-239.

- Rivero, C., Paolini J., Senesi N., y D´Orazio V. (1998b). Spectroscopic characterization of humic acid from a soil toposequence in Venezuelan Plains (llanos). Comum. Soil. Plant Anal. 29(19/20):2 893-2 904.

- Rivero, C. (2001). La materia orgánica estable del suelo y su caracterización. Venesuelos 9 (1 y 2): 5-15.

- Rodríguez, M.; Venegas, J.; Angoa, M.; Montañez, J. (2009). Extracción secuencial y caracterización fisicoquímica de ácidos húmicos de diferentes compost y su efecto sobre cultivos de trigo. Bioagro 21(3): 183-188.

- Ruiz, M.; Elizalde, G. y Paolini, J. (1997). Caracterización de las sustancias húmicas presentes en microagregados de suelos de dos toposecuencias. Agronomía Trop. 47(4): 381-395.

- Sánchez, B., Ruiz, M., y Rios, M.M., (2005) Materia orgánica y actividad biológica del suelo en relación con la altitud, en la cuenca del río Maracay, estado Aragua. Scielo. Agronomía trop. 55 (4): 507-534.

- Schnitzer, M y Khan, S (1972). Humic substances in the eviroment. *Soil Science*, 151: 41-58.

- Schnitzer, M (1990). Select methods for the characterization of soil humics substances. p. 65- 89.

- Schollenberger, C. y Simon, R. (1945). Determination of exchange capacity and exchangeable bases in soil- Amonium acetate method. *Soil Sci.,* 59: 13-24.

- Senesi, N, 1992. Metal-humic substance complexes in the environment. Molecular and mechanistic aspect by multiple spectroscopic approach. In Biogeochemistry of trace metals. D. C. Adriano (ed.) Lewis Publishers. London. pp. 429-496.

- Shulten, H and Schnitzer, M (1993). A state of the art structural concept for humic substance. *Geo Sci*, 10 (2): 117- 145.

- Stevenson, F. J. y K. M. Goh. (1971). Infrared spectra of humic acid and related substances. Geochim. et Cosmochim. Acta. 35:471-483.

- Stevenson, F. J. (1982). Humus Chemistry, Genesis, composition, Reaction. John Wiley and Sons, New York. 443 p.

- Steveson, F. (1994). Humus chemistry: genesis, composition and reaction. 2nd edition. *Edit John Wiley & Sons, Inc. New York.*

- Stotzky, G. (1965). Microbial respiration. En: *Methods of Soil Analysis.* Part 2 (Black, C.; Evans, D.; Ensminger, L.; White, J. and Clark, F., editores). American society of Agronomy, Madison, USA. Pp. 1550-1572.

- Swift, R. S. (1991). Effects of humic substances and polysaccharides on soil aggregation. In: Advances in Soil organic matter research: the impact on agriculture and the environment. (Wilson, W.S, editor). The Royal Society of Chemistry. Thomas Graham House, Cambridge. pp. 153-162.

- Tan, K. H. (1996). Soil Sampling preparation and analysis. 10º ed. Madison, N.Y. USA. P.p. 408.

- Varanini, Z. y Pinton, R. (1995). Humic substances and plant nutrition. Progress in Botany, 56, 97-116.

- Walkley, A. y Black, I (1934). An examination of the Degtjaeff method for determining soil organic matter, and a proposed modification of the chromic acid titration method. Soil Sci. 37: 29-38.

- Walinga, I.; Kithome, M.; Novozamsky, I.; Houba, V.J.G. y J.J Van der Lee (1992). Spectrophotometric determination of organic carbon in soil. Commun. Soil.Sci. Plant Anal. 23 (15&16): 1935-1944.

# APÉNDICE

## Tabla 11. Datos de la determinación de humedad

| Nº muestra | Pma (±0.0001) | Pme (±0.0001) | Humedad (%) |
|---|---|---|---|
| **1.A** | 5,1545 | 4,3276 | 16,0 |
| **2.A** | 5,0888 | 4,2859 | 15,8 |
| **3.A** | 5,0486 | 4,2625 | 15,6 |
| **1.B** | 5,0812 | 4,5856 | 9,8 |
| **2.B** | 5,0960 | 4,5904 | 9,9 |
| **3.B** | 5,0466 | 4,5540 | 9,8 |

Pma: Peso de la muestra secada al aire
Pme: Peso de muestra secada en estufa a 105ºC
*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

## Tabla 12. Datos de la determinación de Materia volátil

| Nº muestra | Pma (±0.0001) | Pmc (±0.0001) | Materia Volátil (Base seca) |
|---|---|---|---|
| **1.A** | 1,0010 | 0,2011 | 23,9 |
| **2.A** | 1,0860 | 0,2036 | 23,7 |
| **3.A** | 1,0021 | 0,2008 | 23,8 |
| **1.B** | 1,0186 | 0,1892 | 19,3 |
| **2.B** | 1,0073 | 0,1871 | 20,6 |
| **3.B** | 1,0080 | 0,1898 | 20,9 |

Pma: Peso de la muestra secada al aire
Pmc: Peso de muestra calcinada a 950ºC
*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011*

**Tabla 13. Datos de la determinación de Cenizas y Carbono fijo**

| Nº muestra | Pma (±0.0001) | Pmc (±0.0001) | Cenizas (%) (Base seca) | Carbono fijo (%) (Base seca) |
|---|---|---|---|---|
| **1.A** | 1,0290 | 0,1914 | 22,1 | 54,05 |
| **2.A** | 1,0152 | 0,1899 | 22,2 | 54,05 |
| **3.A** | 1,0289 | 0,1927 | 22,2 | 53,96 |
| **1.B** | 1,0289 | 0,1549 | 16,7 | 62,5 |
| **2.B** | 1,0164 | 0,1537 | 16,8 | 62,6 |
| **3.B** | 1,0119 | 0,1514 | 16,6 | 62,5 |

Pma: Peso de la muestra secada al aire

Pmc: Peso de muestra calcinada a 750ºC

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 14. Datos de la determinación de carbono en las muestras**

| Nº muestra | Mg de muestra | Absorbancias | Cont. de C Total (%) | Materia Orgánica (%) |
|---|---|---|---|---|
| **1.A** | 20,40 | 0,729 | 46,6 | 81,1 |
| **2.A** | 20,10 | 0,717 | 46,5 | 81,0 |
| **3.A** | 20,20 | 0,739 | 47,7 | 83,0 |
| **1.B** | 20,90 | 0,599 | 37,4 | 65,1 |
| **2.B** | 20,30 | 0,570 | 36,6 | 63,8 |
| **3.B** | 20,90 | 0,658 | 41,1 | 71,5 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 15. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico total**

| Patrón | Alícuota (ml) | mg C | Absorbancia |
|---|---|---|---|
| **0** | 0 | 0,00 | 0 |
| **1** | 1 | 0,51 | 0,194 |
| **2** | 5 | 2,55 | 0,392 |
| **3** | 10 | 5,09 | 0,553 |
| **4** | 20 | 10,19 | 0,792 |
| **Concentración de glucosa (mg C/ml)** | | | 50,9498 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

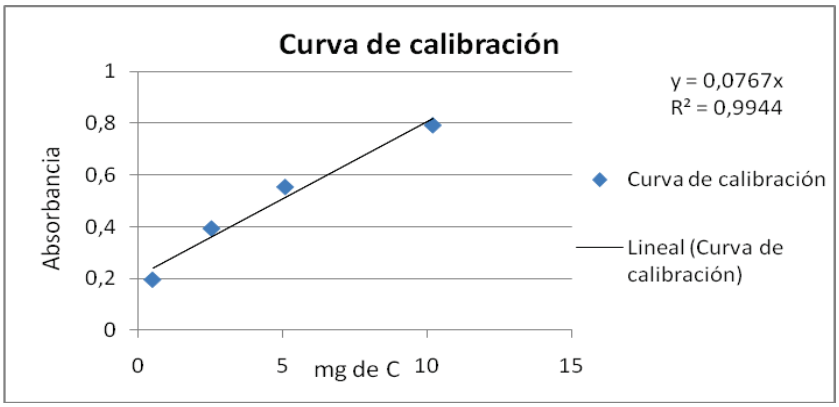



**Figura 14. Curva de calibración de carbono orgánico**

**Tabla 16. Datos del fraccionamiento de la materia orgánica**

| Nº muestra | Absorbancia | | | |
|---|---|---|---|---|
| | SH | AH | AF | SNH |
| **1.A** | 0,764 | 0,327 | 0,040 | 0,053 |
| **2.A** | 0,763 | 0,352 | 0,042 | 0,052 |
| **3.A** | 0,784 | 0,360 | 0,039 | 0,062 |
| **1.B** | 0,771 | 0,358 | 0,034 | 0,031 |
| **2.B** | 0,727 | 0,334 | 0,031 | 0,039 |
| **3.B** | 0,662 | 0,360 | 0,034 | 0,032 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 17. Porcentajes encontrados en el fraccionamiento**

| Muestra | % SH | % AH | % AF | % SNH |
|---|---|---|---|---|
| **1.A** | 27,4 | 23,5 | 1,4 | 0,7 |
| **2.A** | 28,2 | 26 | 1,5 | 0,7 |
| **3.A** | 29,1 | 26,7 | 1,4 | 0,9 |
| **1.B** | 27,8 | 25,8 | 1,2 | 0,4 |
| **2.B** | 27,1 | 24,9 | 1,1 | 0,6 |
| **3.B** | 24,6 | 26,7 | 1,2 | 0,5 |
| **promedio A** | 28,2±0,9 | 25,4±1,7 | 1,4±0,1 | 0,8±0,1 |
| **promedio B** | 26,5±1,7 | 25,8±0,9 | 1,2±0,1 | 0,5±0,1 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 18. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico en las fracciones tratadas con 4ml de Dicromato de potasio**

| Patrón | V (ml) alícuota | mg C | Absorbancia |
|---|---|---|---|
| **0** | 0 | 0,0 | 0 |
| **1** | 1 | 0,4634 | 0,039 |
| **2** | 5 | 2,3168 | 0,158 |
| **3** | 10 | 4,6336 | 0,415 |
| **4** | 20 | 9,2672 | 0,860 |
| **5** | 25 | 11,5841 | 1,048 |
| **Concentración de glucosa (mg C/ml):** | | | 46,3362 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

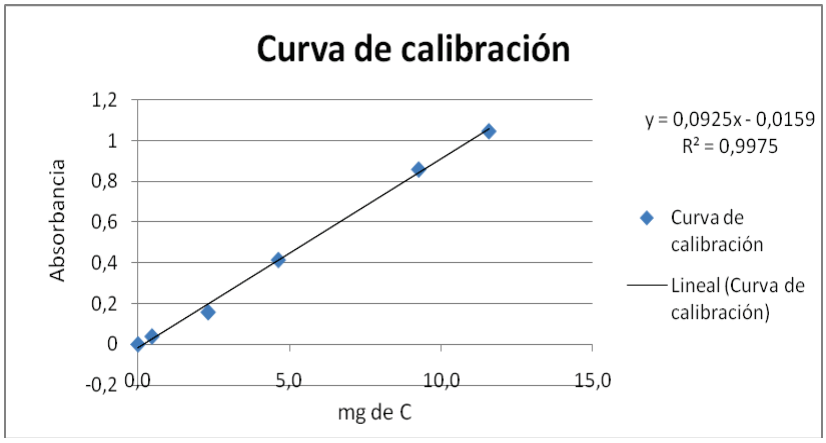



**Figura 15. Curva de calibración para las fracciones tratadas con 4ml de dicromato de potasio**

**Tabla 19. Datos para la curva de calibración de carbono orgánico en las fracciones tratadas con 2ml de dicromato de potasio**

| Patrón | V (ml) alícuota | mg C | Absorbancia |
|---|---|---|---|
| **0** | 0 | 0,0 | 0,02 |
| **1** | 2 | 0,9955 | 0,116 |
| **2** | 5 | 2,4888 | 0,288 |
| **3** | 10 | 4,9776 | 0,471 |
| **4** | 15 | 7,4664 | 0,750 |
| **5** | 20 | 9,9552 | 0,964 |
| **Concentración de glucosa (mg C/ml):** | | | 49,7760 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

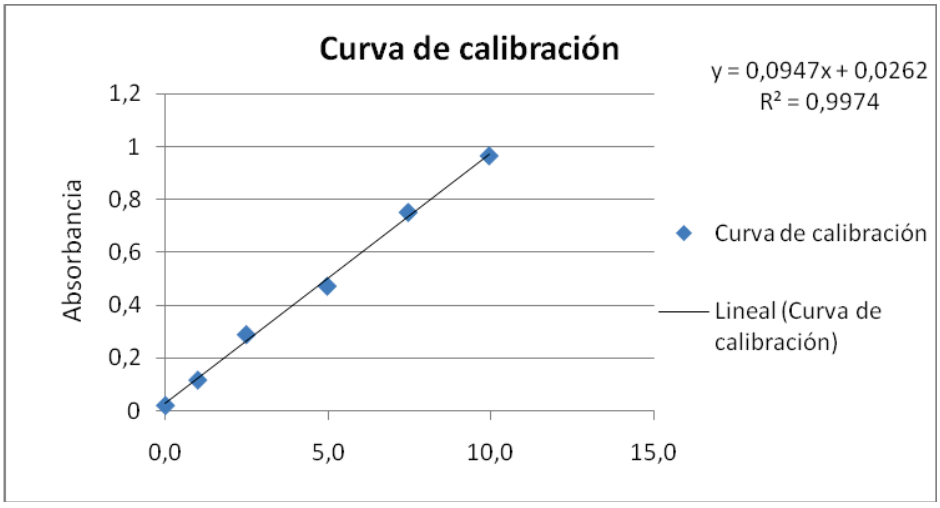



**Figura 16. Curva de calibración para las fracciones tratadas con 2ml de dicromato de potasio**

**Tabla 20. Datos para la determinación de carbohidratos totales**

| Muestra | Gramos (±0.0001) | Absorbancia |
|---|---|---|
| **1.A** | 0,0268 | 0,169 |
| **2.A** | 0,0248 | 0,204 |
| **3.A** | 0,0260 | 0,214 |
| **1.B** | 0,0262 | 0,150 |
| **2.B** | 0,0260 | 0,175 |
| **3.B** | 0,0253 | 0,200 |
| **Blanco A** | 0,0257 | 0,071 |
| **Blanco B** | 0,0256 | 0,025 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 21. Datos para la curva de calibración para la determinación de carbohidratos totales**

| Patrón | V alícuota (µL) | mg C/mL | Absorbancia |
|---|---|---|---|
| **1** | 0 | 0,0 | 0,04 |
| **2** | 10 | 0,1947 | 0,093 |
| **3** | 20 | 0,3895 | 0,141 |
| **4** | 30 | 0,5842 | 0,233 |
| **5** | 40 | 0,7790 | 0,298 |
| **6** | 50 | 0,9737 | 0,346 |
| **Concentración de glucosa (mg C/µL):** | | | 0,0195 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

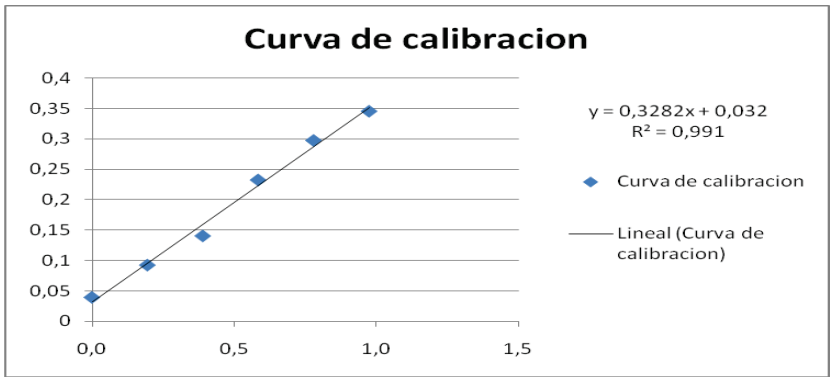



**Figura 17. Curva de calibración para las determinación de carbohidratos**

**Tabla 22. Datos para la determinación del número de neutralización**

| Muestra | Gramos (±0.0001) | Volumen (mL) titulante a pH 8 | Volumen (mL) a pH 8-10 |
|---|---|---|---|
| **1.A** | 0,0085 | 0,64 | 0,25 |
| **2.A** | 0,0090 | 0,63 | 0,31 |
| **3.A** | 0,0088 | 0,63 | 0,31 |
| **1.B** | 0,0095 | 0,70 | 0,29 |
| **2.B** | 0,0097 | 0,69 | 0,33 |
| **3.B** | 0,0094 | 0,70 | 0,32 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 23. Datos para la determinación de la CIC**

| Muestra | Gramos (±0.0001) | Volumen NaOH (ml) | Moles |
|---|---|---|---|
| **1A** | 5,0055 | 26,8 | 0,00246 |
| **2A** | 5,1186 | 29,1 | 0,00268 |
| **3A** | 5,1715 | 28,3 | 0,00260 |
| **1B** | 5,0801 | 18,6 | 0,00168 |
| **2B** | 5,0652 | 20,2 | 0,00183 |
| **3B** | 5,0619 | 19,7 | 0,00178 |
| **Blanco** | | 1,0 | |
| **[NaOH]** | | 0,0953 | |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 24. Datos para la determinación de actividad microbiológica**

| Día | | 7 | 12 | 19 | 24 | 34 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Muestra** | **Peso (g)** | **Volumen de HCl gastado** | | | | |
| **1A** | 50,1807 | 12,9 | 17,8 | 17,4 | 19,5 | 20,3 |
| **2A** | 50,8293 | 13,2 | 13 | 17,2 | 19,6 | 20,2 |
| **3A** | 50,8104 | 13 | 17,8 | 18,2 | 21,1 | 21,6 |
| **1B** | 50,0372 | 14 | 16,5 | 14,5 | 19,9 | 19,1 |
| **2B** | 50,3155 | 15,1 | 16,6 | 14,6 | 20,2 | 19,9 |
| **3B** | 50,5230 | 13,8 | 18 | 19,6 | 18,4 | 18,5 |
| **Blanco** | | 15,5 | 19,4 | 21,7 | 21,5 | 21,7 |
| **[HCl]** | | 0,0604 | 0,0604 | 0,0504 | 0,0509 | 0,1063 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

**Tabla 25. Datos para la determinación de la relación $E_4/E_6$**

| Muestra | Absorbancia | |
|---|---|---|
| | 465 nm | 665 nm |
| **1A** | 0,647 | 0,114 |
| **2A** | 0,671 | 0,116 |
| **3A** | 0,712 | 0,124 |
| **1B** | 0,609 | 0,110 |
| **2B** | 0,594 | 0,103 |
| **3B** | 0,590 | 0,098 |

*Fuente: Laboratorio de Investigaciones Bioquímicas, FACYT-UC (2011)*

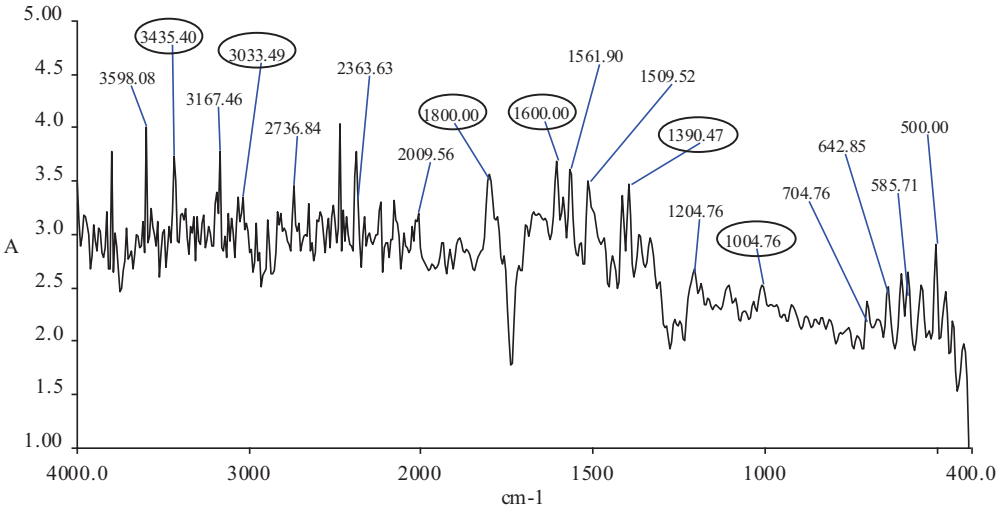



**Figura 18. Espectros IR de acido húmico proveniente de Lignito A**

*Fuente: Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigaciones, FACYT-UC (2011)*

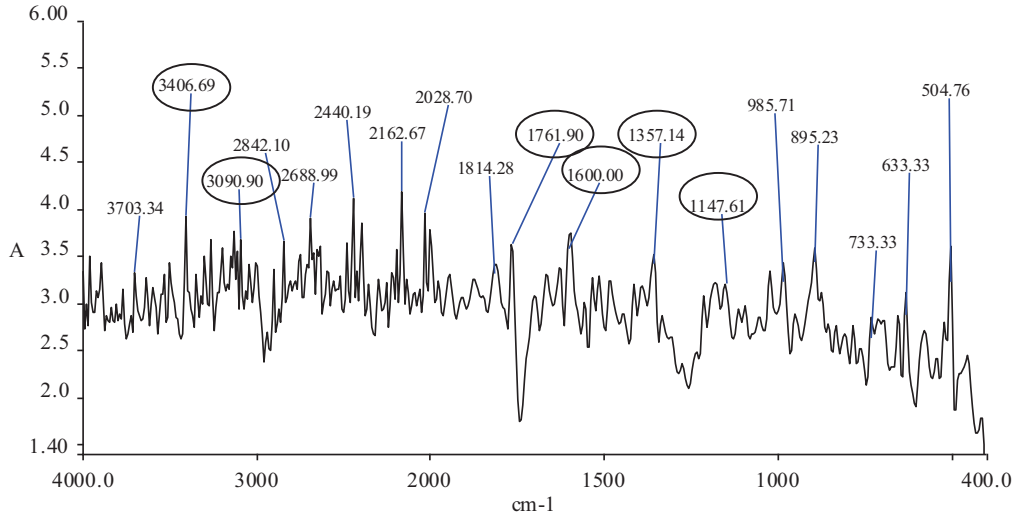



**Figura 19. Espectro IR de acido húmico proveniente de Lignito B**

*Fuente: Laboratorio de Servicios Analíticos e Investigaciones, FACYT-UC (2011)*