

DETERMINACION DE GRUPOS FUNCIONALES OXIGENADOS

EN LA MATERIA HUMICA DEL SUELO

X/994

por

Francisco Martín Martínez

Visado en Sevilla el
5 de Julio de 1.963

EL CATEDRÁTICO
Director y Padrino

Trabajo presentado para
aspirar al Grado de Doç-
tor en Ciencias, Sección
de Químicas.

Sevilla, 5 de Julio de 1963

Firmado: Francisco Gon-
zalez Garcia, Catedrático
co de Química Inorgánica
de la Facultad de Cien-
cias de la Universidad
de Sevilla.

Firmado: Francisco Martín
Martínez, Licenciado en
Ciencias, Sección de Quí-
micas.

El presente trabajo ha sido realizado en los laboratorios del Instituto de Química Agrícola de la Escuela Superior de Agricultura del Politecnico Federal Suizo en Zürich.

Agradezco al Consejo Superior de Investigaciones Científicas la concesión de una beca que hizo posible mi estancia en dicho Centro.

Al Profesor Doctor don Francisco González García agradezco los consejos y su ayuda en la discusión y revisión de este trabajo y su gentileza al apadrinar este Tesis.

Al Prof. Dr. R. Bach y al Kuratorium des Fonds zur Förderung der Wald-und Holzforschung agradezco la ayuda y contribución al desarrollo de este estudio. A los Doctores Dubach y Mehta, agradezco también la ayuda prestada en la preparación y discusión de los datos aquí presentados.

Y por último quiero agradecer a mi esposa su gran contribución al total desarrollo del presente trabajo.

S U M A R I O

	pág.
1 INTRODUCCION	
11 Ideas generales sobre la materia húmica del suelo	1
12 Grupos funcionales de la materia húmica del suelo	17
13 Plan del presente trabajo	31
2 PARTE EXPERIMENTAL	
21 Materiales y métodos empleados	
211 Consideraciones generales	33
212 Suelo empleado	36
213 Extracción de los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos pardos y fracciones dializables.	38
214 Consideraciones teóricas sobre el diborano	41
215 Obtención del diborano	48
216 Determinación del hidrógeno activo con diborano	51
217 Reducción con diborano	54
218 Consideraciones sobre el borohidruro sódico	55
219 Determinación del grupo carbonilo con borohidruro sódico	61
2110 Consideraciones sobre el $AlLiH_4$	64
2111 Reducción con el $AlLiH_4$	65
2112 Métodos de acetilación	66
2113 Métodos de metilación	72
2114 Determinación de la acidez total con hidróxido bórico	75
2115 Determinación del grupo carboxilo con acetato bórico	76
2116 Obtención de los espectro de infrarrojo(IR) y ultravioleta(UV)	76

	pág.
22 Resultados y discusión	78
221 Discusión final	114
3 CONCLUSIONES	121
4 BIBLIOGRAFIA	125

I.1. Ideas generales sobre la materia húmica del suelo

La materia orgánica del suelo, el Humus, se puede considerar formada por los residuos y sustancias muertas, vegetales y animales que se encuentran en el suelo ó sobre él, sometidos a un proceso continuo (química o bioquímica) de destrucción, transformación y nueva formación.

Este concepto abarca por lo tanto la totalidad de las sustancias orgánicas del suelo, incluso los microorganismos, pequeños animales y raíces. Sin embargo las sustancias vivas representan solo una pequeña parte de ese total.

El papel del humus en el suelo es de gran importancia. El humus es uno de los agentes que intervienen en mayor grado en la determinación de la fertilidad del suelo, en la movilización de coloides inorgánicos, en la retención de agua, en la adsorción de bases y, en fin, en el conjunto de caracteres del suelo que definen su tipología y clasificación.

La influencia del Humus en las plantas es también significativa. Al principio, según las teorías de Liebig, se consideraba imposible la absorción de sustancias orgáni-

cas a través de las raíces de las plantas. Hoy está probado, por diversos autores que tanto las plantas heberótrofes como las autótrofas toman del suelo no solo compuestos orgánicos de bajo peso molecular, sino también, de alto peso molecular que son posteriormente transformados. Para algunos autores (18) el Humus es una reserva de alimentos para las plantas.

La Materia Orgánica del suelo o Humus, es una mezcla de muchos y diferentes compuestos. Ya desde los primeros trabajos de Shorey y Schreiner (76) se conocen una gran cantidad de dichos compuestos.

Entre otras se han extraído del suelo y han sido bien comprobadas las siguientes sustancias:

Compuestos alifáticos:

Hidrocarburos

ácidos: acético, oxálico, láctico, malónico, cítrico, monohidroxisteárico, dihidroxisteárico, acrílico, crotonico, etc.

amidas y aminas: urea, trimetilamina, colina, creatina.

Compuestos alicíclicos: estearina, ácido inositolofosfórico.

Compuestos aromáticos: aldehídos, ácidos y productos de degradación de la lignina.

Compuestos heterocíclicos: ácidos piridincarbónico, pirimidina, purina.

Ácidos grasos y fosfátidos

Hidratos de carbono: hexosas, pentosas, metilpentosas, ácidos urónicos, hexosaminas, polisacáridos.

Aminoácidos y proteínas

Ácidos nucleínicos

Vitaminas

Antibióticos.

Debe señalarse, sin embargo, que algunas de estas sustancias, por ejemplo los ácidos nucleínicos, se encuentran en el suelo solo en cantidades muy pequeñas.

Las sustancias que integran el humus se han reunido en dos grupos: materia húmica y materia no húmica. Dentro de este último grupo se engloban todas las citadas anteriormente.

Se incluyen en la materia húmica, las sustancias coloreadas amarillas, pardas y hasta negras, de carácter ácido y peso molecular relativamente alto. (En esta definición no están incluidas otras sustancias coloreadas, como carbon, melamina, melancoidina, productos de polimerización de fenoles y quinonas, productos de hidrólisis de proteínas é hidratos de carbono, etc.). Las materias húmicas son relativamente estables y representan más del 50 % de las sustancias orgánicas del suelo. Al contrario de las proteínas e hidratos de carbono, son estables a la acción de los microorganismos.

Se sabe poco sobre la constitución química de la materia húmica, una de las sustancias naturales peor conocidas hasta la fecha.

La materia húmica se encuentra en el suelo en íntimo contacto con los restantes componentes de éste, por lo que no existe en estado completamente libre en cantidades apreciables. No puede extraerse del suelo con agua, pero sí por la acción de diversos agentes que desplazan los cationes polivalentes; por ejemplo, ácidos, álcalis, agentes formadores de complejos, etc. Incluso después de la extracción, es difícil obtener la materia húmica libre de impurezas inorgánicas (arcillas, sesquióxidos, sílice) u orgánicas (hidratos de carbono, proteínas). De aquí que las di-

ferencias que existen entre la materia húmica extraída de suelos diferentes no se deban solo a la distinta naturaleza de aquella sino que dependen en gran parte de la del resto de los otros constituyentes del suelo.

En tanto que las sales de la materia húmica con los cationes monovalentes son solubles, la solubilidad de la materia húmica libre depende en gran parte de su peso molecular. De aquí que solo las fracciones de mas bajo peso molecular (los llamados ácidos fulvicos) sean francamente solubles.

Segun Flaig (34), parece evidente una unión íntima entre los coloides minerales del suelo y la materia húmica, por lo que una separación total de ambos constituyentes resulta difícil. Este hecho está relacionado probablemente con la dificultad que presenta la extracción de una parte de la materia húmica, la humina.

En suelos ácidos, tales como los Podsoles, la materia húmica se encuentra principalmente como humato de hierro y aluminio, en tanto que en suelos de alto contenido en calcio, existe al estado de humato cálcico. Parece por ello que algunas de las propiedades físicas de la materia húmica vienen influenciada por la naturaleza del catión saturante (10).

El primer problema que se presenta al tratar de estudiar la materia húmica de suelo, es el de su extracción. Un buen método de extracción de la materia húmica debe de cumplir los requisitos siguientes: 1) poder ser aplicable a todos los tipos de suelos con el fin de hacer estudios de comparación, 2) inalterabilidad de la materia húmica extraída, 3) pureza de los extractos, y 4) debe asegurar una extracción completa de todas las fracciones representativas de la materia húmica.

La primera condición indicada es la causa principal de que se hayan propuesto y empleado muchos agentes de extracción. Entre otras causas la estrecha relación entre la materia húmica y la fracción mineral del suelo y la distinta naturaleza de esta en suelos diferentes dificulta la aplicación de un determinado agente de extracción a todas las clases de suelos.

Mayores aun son las dificultades en cuanto a la segunda condición expresada ya que, debido a que al menos durante el proceso de la extracción y a su notable labilidad, la materia húmica es ligeramente hidrolizada, oxidada, decarboxilada y condensada. El tercer punto es una cuestión discutida pues mientras algunos autores opinan que determinados elementos y compuestos son constituyentes de la materia húmica otros los consideran como impurezas (tal es el caso del nitrógeno). Por lo que respecta a la cuarta condición mencionada en cuanto que una extracción completa lleva implícita el empleo de agentes más enérgicos, a causa de lo cual la materia húmica no puede ser extraída por ello de una manera inalterada.

Existen una gran cantidad de agentes extractores, los cuales se exponen en la tabla siguiente (69) :

Agentes alcalinos

Hidroxidos alcalinos: hidróxido sódico, hidróxido potásico, hidróxido amónico.

Sales alcalinas : Carbonato, acetato, tetraborato, fosfato, sulfito.

Disolventes orgánicos: Piridina, trietanolamina, etilendiamina.

Agentes neutros

Sales alcalinas: Fluoruro, oxalato, fosfato, tartrato, salicilato, citrato, lactato, formiato, acetato, fosfato condensado, malonato.

Soluciones acuosas de : hexametiltetraamina, urea.

Formadores de quelatos: acetiacetona, cupferron, oxina en acetona.

Disolventes orgánicos con grupos - O - ð - N -

Dioxan, tetrahidrofurano, dimetilsulfoxido, formamida, dimetilformamida.

Agentes ácidos

Acidos inorgánicos: clorhídrico, fluorhídrico

Acidos orgánicos : fórmico, salicílico, benzoico, acético cítrico y oxálico.

Los agentes alcalinos han sido los más usados, ya que son los que extraen mayor cantidad de materia húmica del suelo. Sin embargo, es bien conocido que estos agentes de extracción son los que más alteran la materia húmica, al mismo tiempo que extraen una gran cantidad de materiales no húmicos, tales como lignita, polisacaridos.

El empleo de agentes neutros o debilmente alcalinos han sido tambien muy estudiados (5,15,11,21,26, 83) pero son menos efectivos que los hidroxidos alcalinos; su poder extractante puede aumentarse por pretratamientos del suelo con ácidos (ClH, ClH/FH) con el fin de destruir la unión de la materia húmica con la fracción inorgánica de aquel. Como las sales alcalinas de las diversas fracciones de la materia húmica, con excepción de las de alto peso molecular, son solubles a pH comprendido entre 7 y 8, una gran parte de aquellas pueden extraerse con tal que se hayan eliminado anteriormente los cationes polivalentes.

Se han usado tambien algunos agentes orgánicos de extracción, en especial mezclados con algo de agua (21,1). Su empleo, sin embargo, no es recomendable ya que al mismo tiempo extraen muchos materiales no húmicos.

Las impurezas que generalmente acompañan a la materia húmica al ser extraída del suelo son de dos tipos: inorgánicas y orgánicas.

Para eliminar las primeras (sales, sesquióxidos, sílice, arcilla) no existen grandes problemas. De hecho el contenido en cenizas se puede rebajar a menos de un 2 % mediante la combinación de diferentes métodos, tales como electroforesis, precipitaciones sucesivas, centrifugación, pretratamientos del suelo con ácidos, empleo de resinas cambiadoras de cationes, etc. Mediante estos tratamientos se han obtenido a veces fracciones de la materia húmica totalmente libres de cenizas.

orgánicas que acompañan a las materias húmicas, puede dividirse en dos partes:

1^o. Por lo que se refiere a la eliminación de grasas y resinas, las cuales pueden reconocerse inmediatamente, y que pueden ser eliminadas mediante extracción con diferentes disolventes orgánicos o bien durante las manipulaciones para eliminar el agente extractor empleado.

2^o. Por lo que respecta a hidratos de carbono y proteínas, Forsyth (36) ha separado hidratos de carbono de ácidos fulvicos mediante la absorción en carbon activo; y Roulet (64) ha conseguido reducir el contenido en hidratos de carbono en la fracción de ácidos fulvicos de un suelo no podsólico desde un 25 a un 5 %. El mismo autor por absorción en columnas de celulosas y sulfometilcelulosas ha conseguido bajar el contenido en nitrógeno en gran proporción. Ruchti (65) ha obtenido mediante resinas de cambio una fracción de bajo peso molecular totalmente libre de nitrógeno. Sin embargo no se ha conseguido de momento un método específico para eliminar completamente los hidratos de carbono y las proteínas.

Respecto a otras impurezas orgánicas, tales como lignina y taninos, solo se ha conseguido hasta la fecha obtener fracciones de materia húmica donde estas impurezas se concentran, en tanto que otras fracciones se encuentran libres de ellas.

Por lo que se refiere al fraccionamiento de la materia húmica, los diversos criterios están basados en la solubilidad a distintos pH; precipitación como sales de cationes polivalentes; absorción sobre columnas de carbon, celulosa, óxido de aluminio, etc. ; cromatografía, resinas de cambio, peso molecular, etc. El valor de los diversos métodos de fraccionamientos es muy relativo, a pesar de lo

cual y desde los primeros estudios sobre humus se han generalizado diferentes tipos de fraccionamientos y clasificaciones, la más común de las cuales se expone a continuación :

Humus

Materia húmica

Materia no húmica

ácidos fulvicos

ácidos húmicos

ác. húmicos pardos y grises

solubles en NaOH diluida

Solubles en NaOH concentrada

Solubles en ácidos

insolubles en ácidos

El estudio de la materia húmica se ve dificultado por la imposibilidad no superada hasta la fecha de realizar su obtención a partir de monómeros. Algunas de sus propiedades nos permiten, sin embargo, obtener cierto conocimiento sobre su estructura y configuración. En este sentido su comportamiento frente a las membranas de diálisis indican que se comporta como un sistema coloidal; su difícil solubilidad en diferentes disolventes orgánicos está de acuerdo con una estructura macromolecular; se conoce asimismo su naturaleza redox; forma complejos con metales pesados y está ligeramente decarboxilada.

Por medidas de la viscosidad específica y de la viscosidad relativa se ha llegado a la conclusión de que la materia húmica está formada por coloides esféricos.(32).

El estudio de las fotografías electronmicroscópicas ha demostrado que el tamaño de las partículas corresponde a un diámetro del orden de 60-80 Å, valor que concuerda con el obtenido por Jung (43), que mediante la sorción de

materia húmica en partículas de montmorillonita de tamaño conocido, halló un diámetro de 80 Å aproximadamente.

Asimismo, por medidas de difusión, Scheele (67) llegó a la conclusión de que el tamaño de las partículas es del orden ya indicado.

Durante los primeros años de la investigación de la materia húmica, se obtuvieron pesos moleculares muy bajos, que no correspondían con otras propiedades ya conocidas de esta sustancia, como solubilidad, densidad óptica, análisis elemental y acidez, todas las cuales, está demostrado, se encuentran en relación con el peso molecular. Sin embargo nuevos métodos de determinación del peso molecular (68, 3, 61, 79,51) dan unos valores que se extienden desde 2.000 para las fracciones solubles en eter hasta 300.000 para los ácidos húmicos. El llamado peso molecular medio varia entre 3.000 y 50.000, existiendo pues bastante espacio para encajar la variación de las propiedades correlativas.

Todas las propiedades mencionadas de la materia húmica pueden resumirse del modo siguiente: Si se supone que la materia húmica está formada por una serie de fracciones que se escalonan desde las de bajo peso molecular a las de mayor grado de polimerización, en este sentido se observa una variación gradual de las siguientes características:

- a) aumento del contenido en carbono
- b) disminución del contenido en hidrógeno
- c) disminución del contenido en oxígeno
- d) disminución de acidez (el peso equivalente aumenta desde 100 hasta 300)
- e) disminución de la solubilidad (las fracciones primeras son solubles en eter, siguen las solubles en ácidos, detras se encuentran las solubles en alcalis y por

último la fracción insoluble.

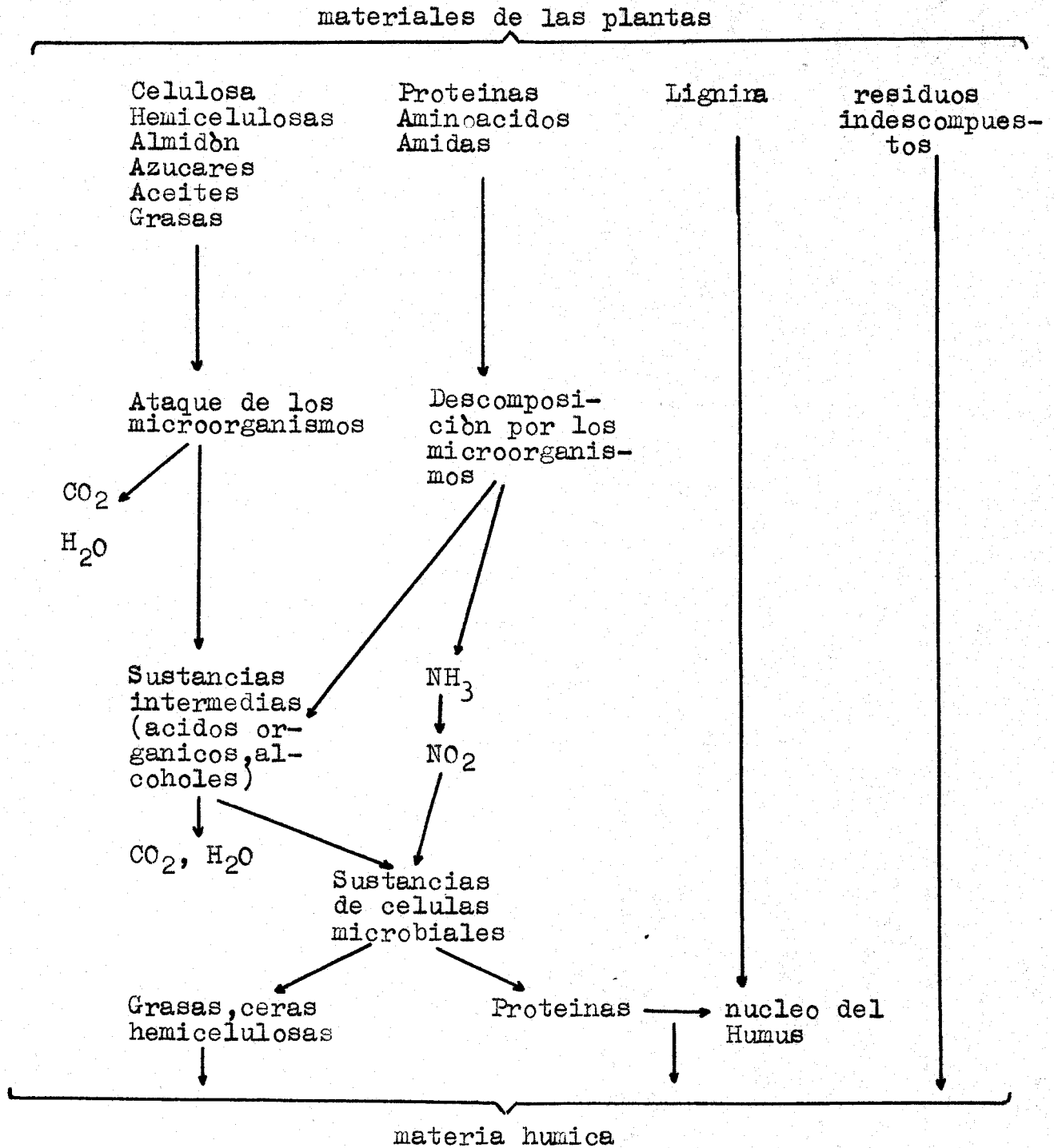
- f) disminución de grupos reactivos
- g) aumento de la absorción en la luz visible y ultravioleta (la absorción aumenta al disminuir la longitud de onda, no mostrando el espectro ni máximos ni mínimos)
- h) aumento del grado de polimerización.

El contenido en nitrógeno es variable (0 - 6 %) y según algunos autores (9) se encuentra como impureza y no como constituyente fijo de la molécula.

La formación de la materia húmica no es un hecho bien aclarado hasta la fecha.

Maillard (49) indica que los azúcares se condensaban con los aminoácidos para formar una sustancia, la melanina, análoga a la materia húmica del suelo.

Waksman (88) sostiene que los ácidos húmicos provienen de la lignina que junto a las proteínas da lugar a unos productos de autólisis, por intervención de las bacterias del suelo. El punto de vista de Waksman queda expuesto en el esquema siguiente:



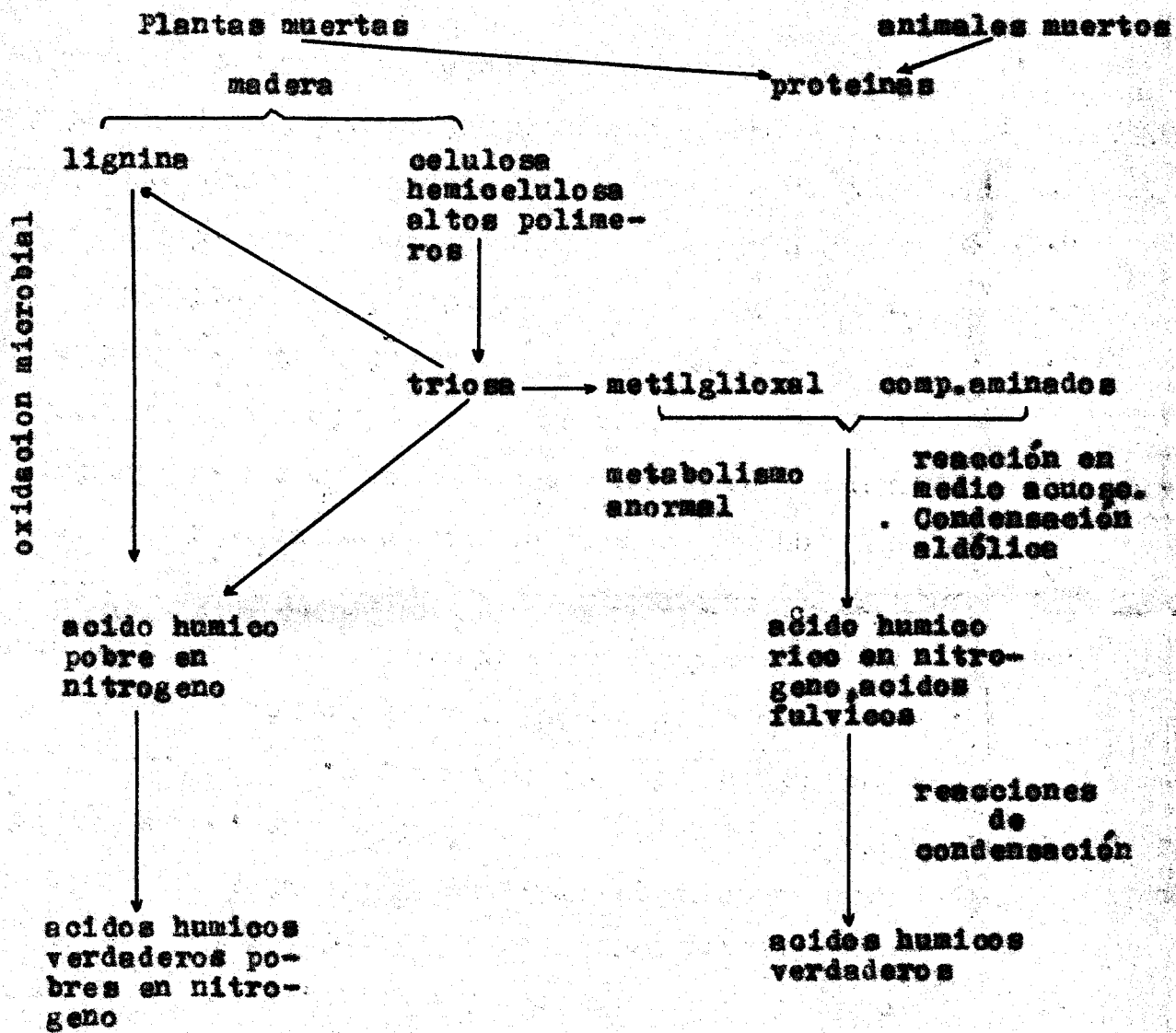
Enders (24) basandose en los trabajos de Maillard, considera que los ácidos húmicos se forman a partir de celulosa y lignina. Segun Enders, la formación de la materia húmica a partir de los hidratos de carbono sigue la fase siguiente:

1) cuando las condiciones naturales resultan poco favorables para el crecimiento de los microorganismos, el metabolismo experimenta un cambio. Asi mientras que en condiciones normales, la descomposición de los hidratos de carbono da lugar a CO_2 , el cambio de metabolismo da lugar a la formación de metilglioxal;

2) bajo la influencia de los aminoácidos o de los productos de descomposición de las proteínas, el metilglioxal se condensa rapidamente para dar lugar a la formación de productos pardos solubles en agua;

3) a medida que avanza el proceso de condensación, estos productos se van convirtiendo en verdaderos ácidos húmicos insolubles en agua.

Las ideas de Enders pueden esquematizarse asi:



Existe también una teoría sostenida por Flaig y Schulze (29), según la cual la transformación de fenoles y por tanto también de la lignina, da lugar a la formación de la materia húmica. El proceso se puede dividir en tres partes:

1) formación de oxiquinonas; 2) ruptura del anillo, dando lugar a la formación de ceto-ácidos muy reactivos; 3) condensaciones sucesivas de estos últimos para dar lugar a la materia húmica.

Las teorías aquí expuestas sobre la génesis de la materia húmica no están muy bien cimentadas, ya que de provenir de la lignina, el contenido en metoxilo debería ser más alto del que se encuentra (se han obtenido fracciones en donde no se encuentra ningún grupo metoxilo) mientras que si procede de las proteínas, el contenido de nitrógeno sería igualmente alto. Como se indicó en otro lugar, muchos autores estiman que este último representa una impureza y no un constituyente esencial de la materia húmica.

Para la determinación de la estructura de la materia húmica existen en principio dos caminos diferentes. Uno de ellos, que consiste en degradar la molécula (por medio de hidrólisis u oxidación) é investigar la naturaleza de los productos resultantes, ha sido seguido con éxito en la química de la lignina y ha dado buenos resultados en el caso de la materia húmica. El otro aborda el estudio de la molécula total investigando el número y naturaleza de los grupos activos, camino usual en la química del carbono.

En los últimos años la degradación de la materia húmica y el estudio de los productos obtenidos, demuestran de un modo evidente la naturaleza predominante de compuestos aromáticos-fenólicos, los cuales fueron expuestos anteriormente aunque sin evidencia convincente. A pesar de ha-

berse estudiado por este método fracciones muy distintas de la materia húmica así como de diversa procedencia, los resultados obtenidos concuerdan bastante en todos los casos. No se excluye, sin embargo, el hecho de que muchas de las sustancias encontradas sean debidas a productos de degradación de las impurezas y a reacciones internas de desmetilación, descarboxilación, condensación, etc. debidas a la naturaleza de los métodos empleados.

Así, por oxidación con diversos agentes se han obtenido una serie de ácidos alifáticos, tales como acético, oxálico, malónico, maleico, málico, láctico. Por hidrólisis con agua y ácidos se han encontrado pequeñas cantidades de ácidos p-hidrobenczoicos, vanillico, protocatéquico, así como los correspondientes aldehidos. Estos últimos son productos clásicos de degradación de la lignina por lo que se piensa que tengan su origen en las impurezas de la materia húmica. Se ha aplicado también la hidrólisis oxidativa con ácido nítrico y se ha encontrado entre los productos una gran variedad de nitroderivados aromáticos. Mediante degradación con álcalis a altas temperaturas (170-250 ° C) se han identificados ácidos mono- y dihidroxibenczoicos, así como diferentes polifenoles. Sin embargo, con todos estos métodos el rendimiento en productos de degradación no alcanza el 10 %.

1.2.- Grupos funcionales de la materia húmica del suelo

El problema de los grupos activos ha sido a menudo estudiado, incluso en los comienzos de los trabajos sobre humus, detallándose a continuación algunos de los más importantes.

Oden (58), describe los ácidos húmicos como ácidos tetrabásicos, y encuentra que la molécula de ácido húmico extraído de turba contiene cuatro grupos carboxilos.

Leopold (46), estudia el contenido de grupos carbonilos en algunos ácidos húmicos.

Eller (23), cree que en los ácidos húmicos por él sintetizados, la acidez no se debe a los grupos carboxilos sino a los grupos hidroxilos, y extiende esta opinión a los ácidos húmicos del suelo.

Fuchs y Stengel (37), investigaron ácidos húmicos de lignito y determinaron los siguientes grupos funcionales: grupos carboxílicos (por metilación con ácido clorhídrico en metanol) y grupos hidroxilo-fenólicos (a través de metilación con diazometano). Asimismo investigaron los grupos hidroxílicos no ácidos (alcohólicos), por metilación con sulfato de metilo. En estos ensayos encontraron que en la molécula de ácidos húmicos existen cuatro grupos carboxílicos y tres grupos hidroxilo-fenólicos.

Hoepner (41) indica que el contenido de grupos carbonilos en los ácidos húmicos fluctua entre 0,4-2,2 %.

Stadnikow y Korschew (77), llegan a la conclusión que los ácidos húmicos de turba contienen cuatro grupos carboxílicos y tres hidroxílicos fenólicos.

Plungiam y Hibbert (62) encuentran en los ácidos húmicos extraídos de lignito, ocho grupos hidroxilos y cuatro grupos carboxílicos, de donde dos de los grupos hidroxí-

licos presentan una ~~ta~~automerización tipo keto-enol.

Schmuck (75) por medio de la esterificación con alcohol etílico en presencia de clorhídrico gaseoso, pone de manifiesto la presencia de grupos COOH.

Tistchenko y Rydalewskaja (84), encuentran que el contenido en grupos hidroxilo-fenólicos y grupos carboxílicos en ácidos húmicos de diferentes suelos, es de tres y cuatro respectivamente.

Ubal dini (85) da un contenido de ocho grupos carboxílicos y tres hidroxílico-fenólicos en los ácidos húmicos.

Natkina (55) encuentra valores más altos en el contenido en hidroxilos fenólicos que es de seis a siete en podsoles y cuatro en tierras negras.

Dragunow (19) determinó en los ácidos húmicos de podsol cuatro grupos hidroxilos fenólicos, y cinco en los de tierras negras.

Broadbent y Bradford (4) indican que el contenido en grupos carboxílicos se encuentra entre un tercio y dos tercios del valor de la acidez total.

Welte (89) en un ácido húmico sintético obtenido a partir de hidroquinona, encuentra que el contenido en grupos hidroxilos determinados por metilación con sulfato de metilo y diazometano, corresponde exactamente con la acidez total determinada por medio de barita, llegando por ello a la conclusión de que dichos ácidos húmicos sintéticos no contienen ningún grupo carboxílico.

Kucharenko (45) mediante la rotura de la molécula con sodio metálico en amoníaco líquido, encuentra que en la molécula de ácidos húmicos extraídos de carbon, se encuentran uniones tipo - O-.

Flaig y colaboradores (30, 31), han estudiado dife-

rentes tipos de materias húmicas tanto del suelo como sintéticas. Por valoración conductimétrica encuentran 3,7 meq/gr; por empleo del dinitrofluorbenzol encontraron 0,65 % de hidroxilos en un ácido húmico pardo y ninguno en un ácido húmico gris. Pero mediante el estudio de sustancias modelos hallaron que los grupos hidroxilos fuertemente ácidos no reaccionaban con el dinitrofluorbenzol. Asimismo mediante el empleo de hidroxilamina encontraron un valor de cerca de 1 meq/gr de grupos carbonilo.

Beckwith (2) valoró acidimétricamente materia orgánica del suelo, tras la adición de Cu^{++} para formar quelatos, y encontró que la relación entre grupos ácidos fuertes y débiles en el extracto de un podsol es del orden de 3:1.

Wright y Schnitzer (91) han estudiado la distribución de oxígeno en los diferentes grupos funcionales de la materia húmica extraída de un podsol. Determinaron la acidez total mediante el empleo de hidróxido bórico bajo atmósfera de nitrógeno durante un periodo de 20 a 24 horas. Investigaron el contenido en hidroxilo por acetilación con la mezcla piridina-anhidrido acético, posterior hidrólisis y valoración. Estudiaron los hidroxilos fenólicos por valoración en medio no acuoso. El grupo carbonilo fué determinado por oximación, y el exceso de hidroxilamina se valoró potenciométricamente con ácido perclórico. Finalmente el grupo carboxílico se determinó por métodos diversos, tomando como base los valores obtenidos por el método del acetato cálcico.

Meyer (53) ha estudiado los grupos funcionales de diversas fracciones de la materia húmica extraída de un podsol, aplicando los recientes métodos analíticos de la

Química Orgánica. Los grupos ácidos fueron valorados en medio libre de agua con hidróxido de tetrabutilamonio en piridina. Los grupos hidroxilos se determinaron por acetilación en acetato de etilo y ácido perclórico, y el grupo carbonilo por oximación en alcohol absoluto.

Los trabajos más recientes sobre la determinación de grupos funcionales en la materia húmica del suelo se encuentran condensados en la tabla nº 1, los valores ~~no son~~ muy comparables debido a la diversidad de tipos de suelo, a los distintos métodos de extracción y al criterio particular de cada autor en lo que respecta a la purificación de las muestras estudiadas.

El carácter ácido de la materia húmica se conoce desde hace mucho tiempo, pero se ha discutido bastante sobre la naturaleza de este carácter ácido, a la vista de los resultados obtenidos en el análisis de los grupos funcionales.

La acidez de la materia húmica puede deberse a grupos carboxílicos, a grupos fenólicos y a los grupos hidroxilo enólicos.

Wright y Schnitzer (92), han estudiado este aspecto en la materia húmica de un podsol, mediante el empleo de los espectros de absorción en el infrarrojo. A $5,85 \mu$ existe una banda en el material original, que puede atribuirse al grupo C=O en general. Si la sustancia se trata con hidróxido sódico a pH 9, se observa una disminución de la intensidad de esta banda apareciendo un incremento a la derecha del espectro. ($6,1-6,3 \mu$). Como los grupos carbonilos de aldehídos y cetonas, no pueden reaccionar con formación de sal con el hidróxido sódico, este hecho parece indicar que la mayor responsabilidad en esa banda debe atribuirse a los grupos carboxílicos. Para comprobar esto último pre-

pitaron los ácidos húmicos por adición de cloruro de hierro con el que aquellos forman la sal de hierro correspondiente. El nuevo espectro de infrarrojo muestra que la banda a $5,85 \mu$ se desplaza hacia la región de $6,1-6,3 \mu$ obteniéndose el mismo efecto que en el caso de la adición de hidróxido sódico.

Van Dijk (86) ha investigado la posibilidad de distinguir los diferentes grupos ácidos, tanto en ácidos húmicos sintéticos como en los naturales, por valoración conductrimétrica en medio acuoso y en medios no acuosos. La valoración conductrimétrica, sobre todo la efectuada a alta frecuencia en dimetilformamida e isopropilato sódico, muestra un máximo en la curva de valoración, que según el autor corresponde al punto de equivalencia de los grupos carboxílicos. El mínimo obtenido corresponde a la cantidad de grupos hidroxilo fenólicos en la molécula. El autor estima que con este método se pueden determinar los grupos ácidos más fuertes de la molécula, los grupos carboxílicos, así como los grupos ácidos débiles, los hidroxilos fenólicos.

Se ha estudiado también por algunos autores (53, 205) la descarboxilación de la materia húmica, indicando que esta descarboxilación corresponde a los grupos carboxilos unidos al núcleo principal de la molécula. Sin embargo parece cierto que por descarboxilación no es posible poner de manifiesto la presencia de los grupos carboxílicos, según ha mostrado Dubach (20) en un estudio bastante amplio sobre la descarboxilación de sustancia orgánica del suelo así como de ácidos húmicos sintéticos de diversas procedencias. En sus trabajos con los ácidos húmicos sintéticos según Erdtman y Granath (25) obtenidos a partir de p-benzoquinona, desprenden anhídrido carbónico al ser tratados

con ácido clorhídrico al 12 % durante 4 horas, é inclusive en agua. De la misma manera los ácidos húmicos sintéticos segun Welte (89) a partir de la hidroquinona, desprenden 1,1 meq/CO₂/gr al ser tratados con ácidos clorhídrico del 12 % durante 4 horas. Sin embargo tanto la p-benzoquinona como la hidroquinona no desprenden anhídrido carbónico al ser sometidas al mismo tratamiento.

Segun Meyer (53) la acidez en la fracción de ácidos fulvicos por él investigada se debe en su mayor parte a grupos enólicos, contribuyendo algo los hidroxilos fenólicos.

Forsyth (35) trabajando con ácidos húmicos de suelos distintos encuentra una gran diferencia entre la capacidad de los grupos hidroxilo para ser metilizados y para ser acetilados y estima que esta diferencia puede atribuirse a la existencia de una tautomeria ceto-enol ya que los grupos OH enólico no pueden acetilarse aunque sí metilarse.

Como resumen se incluye a continuación un estudio crítico de diversos métodos empleados en la determinación de grupos funcionales en la materia húmica del suelo.

Parte de las dificultades existentes pueden atribuirse a la diversidad de materiales empleados y al rigor en que se aplique el criterio de pureza, pero otras ha de adscribirse al caracter macromolecular de la materia húmica (dando lugar a reacciones incompletas, adsorción del reactivo, etc.) polidispersidad extrema (fraccionamiento durante las manipulaciones) sensibilidad hacia los álcalis y hacia álcalis y ácidos a altas temperaturas, y a la proximidad de muchos y diferentes grupos funcionales (influencia de la reactividad de los grupos y especificidad de los reactivos).

Grupo hidroxilo.— En la literatura, hemos citado algunos casos de determinación de grupos hidroxilos por métodos diversos, metilación, acetilación, valoración en medio

no acuoso, etc.

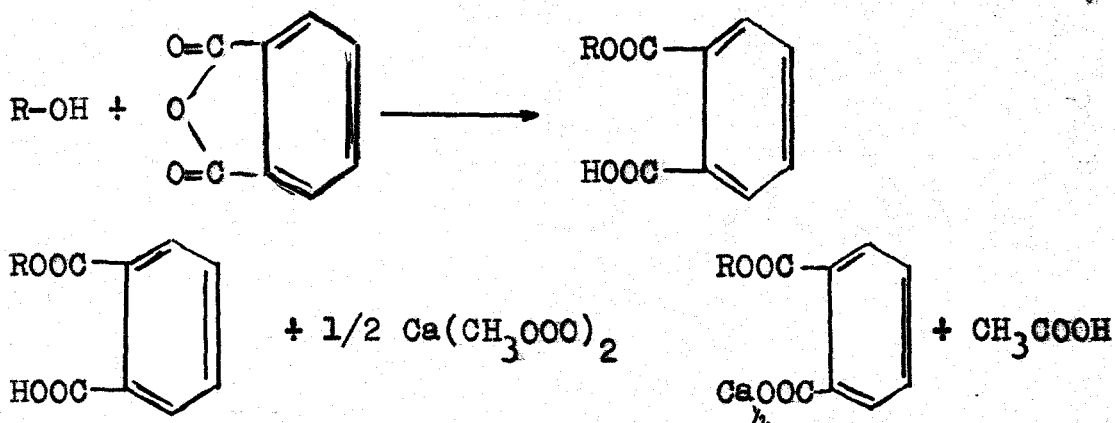
Los grupos hidroxilos presentes en la molécula de la materia húmica, pueden ser de dos tipos: fenólicos y alcohólicos. En tanto que no existe duda sobre la presencia de los primeros no ha sido claramente demostrada la presencia de los segundos a pesar de haber sido investigados por métodos diversos, directos é indirectos.

Como se indicó en otro lugar no puede afirmarse de un modo rotundo la presencia de un determinado grupo de caracter ácido a partir de los datos de valoración en medio no acuoso, puesto que lo que existe es más bien una arbitraria división en ácidos fuertes (pK menor que 4,18) y débiles (pK comprendido entre 4,18-9,92) sin que tales valores puedan adscribirse a determinados grupos característicos (ácidos, fenoles, enoles). Así la 2,5 hidroxiquinona presenta un caracter ácido más fuerte que el ácido acético.

Meyer (53) ha estudiado la determinación fotométrica de los grupos hidroxilos, basandose en trabajos efectuados por Goldschmidt (39) sobre la lignina. El método está basado en la característica absorción en UV de los fenoles en solución alcalina. Midiendo directamente la absorción de una solución alcalina de la muestra contra otra porción de la misma muestra neutralizada. El contenido en fenol de la muestra se calcula a partir del máximo de absorción y del máximo de absorción molar que se obtiene con diferentes sustancias modelos. Este método aplicado a la lignina da resultados comparables con los obtenidos con otros métodos. Meyer aplicó este método a los grupos hidroxilos tomando como valor comparativo el mismo que se empleó para la lignina, pero obtuvo valores muy inseguros dependientes de la concentración de muestra empleada.

Los grupos hidroxilo alcohólicos han sido investigados directa é indirectamente. Lynch y colaboradores (48) de-

terminaron los grupos hidroxílico alcohólicos de ácidos húmicos de carbón, extraídos con tratamiento alcalino, mediante el empleo de anhídrido ftálico en piridina. El método está basado en un trabajo de Pickard y Littlebury (60). Según este método, los alcoholes primarios y secundarios (pero no los terciarios) al reaccionar con el correspondiente anhídrido, dan lugar a un ester ácido muy estable, de fuerza ácida moderada. El ester ácido resultante se valora con álcali, o bien el ester obtenido se trata con acetato cálcico y el acético liberado se valora con álcali.



Sin embargo el método no es aplicable a los alcoholes terciarios ya que ocurre la deshidratación del alcohol y en presencia de hidróxilos fenólicos se forman diferentes productos de condensación en lugar del ester ácido.

Wright y Schnitzer (93) encuentran en la materia húmica de un podsol un alto contenido en hidroxilo alcohólico, hallado por método indirecto, es decir, estudiando el contenido total por medio de acetilación con piridina-anhídrido acético y los grupos hidroxilos fenólicos por medio de valoración en solventes no acuosos. La diferencia entre ambos valores da el contenido en hidroxilos alcohólicos.

Grupo carbonilo.— Este es sin duda el grupo más discutido de la materia húmica del suelo.

En la química de la lignina se ha estudiado el grupo carbonilo de dos modos diferentes, por medio de la hidroxila-

mina y por medio del borohidruro sódico, obteniéndose con ambos métodos resultados acordes.

Flaig y otros han sintetizado ácidos húmicos a partir de sustancias modelo, tales como diferentes quinonas y polifenoles. Las sustancias así obtenidas tienen unos caracteres muy semejantes a los ácidos húmicos naturales por lo que se piensa que la existencia de grupos carbonilos quinoideos es muy probable.

Segun R. Willistatter y K. Cramer (90) se puede comprobar la presencia de grupos carbonilos mediante el carbamato de fenilhidracina. El desprendimiento de nitrógeno que se observa durante este proceso es, segun estos autores, característico de combinaciones con grupos quinoideos.

F. Zetsche y H. Reinhart (95) han reducido los ácidos húmicos con amalgama de sodio, observando que durante la reacción pasa por una serie de coloraciones.

Estos ensayos han sido repetidos por Forsyth (35) observando idénticos cambios de color, pero los productos obtenidos vuelven a tomar su color original al ser agitado al aire. Segun Forsyth, la preparación de esos leucoácidos indican la presencia de hidroxiquinonas en los ácidos húmicos.

W.C. Farmer y R.I. Morrison (27) han efectuado el mismo ensayo pero al mismo tiempo que reducian con amalgama de sodio, metilaban con sulfato de metilo y con diamometano. El contenido en grupos metoxilos al final de la reducción es del mismo orden que antes de reducir, llegando a la conclusión de que quinonas, aldehidos y cetonas o no existen en la molécula o se encuentran en muy pequeña cantidad.

Estos mismos autores (95, 35, 27) y Dubach (20) han reducido la molécula de los ácidos húmicos y metilado luego en presencia de nitrógeno con el fin de evitar una reoxidación, estudiando posteriormente el espectro de infrarrojo y obser-

vando que la banda existente a $5,85 \mu$ (banda que corresponde al grupo carbonilo) apenas se reduce (menos del 10 %). Como está comprobado que el borohidruro sódico reduce la mayor parte de los aldehidos, cetonas y quinonas, concluyen que estos grupos no existen practicamente en la molécula de la materia húmica.

Feustel (28) ha tratado ácido húmico con bromo, obteniendo como producto final tetrabromoquinona.

Zetsche (94) mediante reacción de ácido húmico con ácido clorhídrico y ácido perclórico, obtiene como producto final tetracloroquinona. Estos dos ensayos, parecen indicar la presencia del grupo carbonilo quinoideo.

Grupo ester.- No se ha estudiado mucho la presencia de tal grupo en la molécula de la materia húmica.

Farmer y Morrison (27) indican que la banda que aparece en un espectro de infrarrojo de ácido húmico extraído de carbon, a $6,23 \mu$, puede atribuirse a grupos esteres que estan conjugados con sistemas no saturados.

Schnitzer y colaboradores (92), tambien por estudio del espectro de absorción en el infrarrojo, llegan a la conclusión de una evidente presencia del grupo ester. A $5,65 \mu$ existe una banda debida al grupo carboxilo, banda que se desplaza hacia $6,25 \mu$ cuando se forma la sal, pero quedando todavia un pequeño efecto a $5,85 \mu$. Estos autores saponificaron con hidróxido sódico al 10 % rebajando posteriormente el pH hasta 9. El espectro resultante muestra que la banda a $5,85 \mu$ se desplaza entonces completamente hacia la región de $6,25 \mu$ llegando así a la conclusión de que junto al grupo carboxílico, los ácidos húmicos contienen tambien el grupo ester.

Dobles enlaces. Schmidt y Atterer (74), Mehta y Dubach (53) encontraron anhídrido maleico y ácido maleico respectiva-

mente al oxidar ácidos húmicos con dióxido de cloro. Según Flaig (33) este resultado, en comparación con los efectuados en sustancias modelos, indica la presencia de una cadena de átomos de carbono de los tipos $C-C=C-C$ ó $C=C-C=C$.

Meyer (53) y Dubach (20) han investigado la presencia de dobles enlaces en diversas fracciones de ácidos húmicos por reacción con bromo, encontrando que existe en efecto una absorción de éste último, pero el peso equivalente para un doble enlace varia entre 1.200 (tras un periodo de reacción de 30 minutos) y 500 (tras un periodo de reacción de 24 horas). Ello parece deberse a que para compuestos polímeros que contienen grupos funcionales OH^- y $COOH$, la reacción con bromo es difícil de efectuar. Al mismo tiempo parece que la materia húmica se oxida consumiendo bromo.

Oxígeno etéreo.— No existe un método definido para la determinación de oxígeno etéreo en una molécula. Hasta ahora el método consiste en determinar el contenido total de oxígeno y el que se encuentra en los grupos analizables, hallado aquel por diferencia.

La unión de los monómeros de la materia húmica a través de puentes de oxígeno ha sido muy discutida (29). Según Ziechman (96) esta unión puede ser observada al estudiar el espectro de absorción en el infrarrojo de los ácidos húmicos, encontrándose entre 7 y 8 μ .

Wright y Schnitzer (93) opinan que una parte del oxígeno total de la molécula debe encontrarse en forma de oxígeno etéreo.

Los productos de degradación obtenidos por diversos métodos y autores (80, 11, 42) parecen indicar la presencia de puentes de oxígeno entre los monómeros, ya que la mayor parte de estos productos de degradación, como indicamos anteriormente, son polifenoles y ácidos polifenolcarbonicos.

De todos los grupos funcionales expuestos, solo el grupo carboxilo puede darse como seguro en la molécula de la materia húmica, ya que ha sido determinado por un método que no implica cambio en la molécula ni reacciones laterales (el espectro de infrarrojo) .

El grupo carboxilo ha sido determinado por descarboxilación, pero como se indicó anteriormente este método no es específico de los grupos carboxilo.

También se ha determinado el grupo carboxilo mediante valoración iodométrica (30), pero este método no puede dar valores exactos, puesto que la materia húmica reacciona consumiendo iodo. La determinación cuantitativa de los grupos carboxilo ha sido llevada a cabo mediante reacción con acetato cálcico, valorándose el acético formado. Este método está basado en la especificidad de la reacción del grupo carboxilo con el acetato, liberándose un mol de ácido acético por cada grupo carboxilo, pero según trabajos publicados por Rydasewskaja y Tisschenko (66) y por Stevenson (62), la capacidad de absorción de diferentes fracciones de la materia húmica varía grandemente con el pH, y no está excluida la posibilidad de que los grupos hidroxilos más ácidos reaccionen también, bien solos o bien formando quelatos en combinación con los grupos carboxilo.

En cuanto a los restantes grupos, han sido determinados por métodos no muy específicos en la mayoría de los casos o bien se identificaron después de someter la molécula a tratamientos muy fuertes por lo que conociendo la labilidad de la materia húmica los resultados de estos últimos procedimientos no pueden ser tomados en consideración.

I.4. Plan del presente trabajo

En este trabajo se pretende abordar el estudio de los diferentes grupos funcionales oxigenados existentes en algunas fracciones de la materia húmica é intentar aclarar el proceso de polimerización que lleva consigo. Como material experimental se han elegido una serie de fracciones que por sus características se encuentran comprendidas entre los ácidos fulvicos y los ácidos húmicos.

En la molécula de cualquiera de las fracciones de la materia húmica, se acepta a priori que se encuentran los siguientes grupos funcionales oxigenados:

Grupo carboxilo

Hidroxiolos (tanto ácidos como no ácidos)

Carbonilo (cetónico e quinoideo)

Ester (principalmente en forma de lactomas)

Eter (lineal o cíclico)

Como algunos autores ponen en duda la presencia de grupos carboxílicos, se investigará su presencia y se intentará su determinación cuantitativa. Para esto se procederá a la reducción de éste grupo de una manera total, y se estudiará la sustancia obtenida. Especialmente interesante es la investigación y determinación del hidrógeno activo, es decir del hidrógeno que se encuentra formando parte en los grupos funcionales a cuyo fin hemos empleado y desarrollado una nueva técnica por reacción con diborano.

Tambien se tratará en el presente trabajo de poner en claro la existencia de oxígeno etéreo en la molécula. Como no se conoce un método directo para la determinación de oxígeno etéreo, se determinará por diferencia entre el oxígeno total y el que se encuentra en los restantes grupos funcionales. Como comprobación se efectuará esto mismo después de realizar la reducción de la fracción de la materia húmica.

La comprobación de la existencia de oxígeno etéreo es del mayor interés, ya que puede aclarar en gran parte el tipo de unión existente entre los monómeros que componen la molécula.

Por último y mediante el empleo de diborano, se pretenderá comprobar la presencia de dobles enlaces olefínicos en la molécula, lo cual puede contribuir a aclarar la presencia de cadenas laterales unidas al grupo principal de la molécula.

I I

P A R T E E X P E R I M E N T A L

2.1. MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS

2.1.1. Consideraciones generales

A causa de la dificultad que presenta la elección de un método de extracción y fraccionamiento de la materia húmica aplicable a suelos diferentes, se ha empleado en nuestros experimentos solamente la materia húmica extraída del horizonte B de un podsol, uno de los tipos de suelos estudiados más intensamente en los últimos años, cuyo empleo en este caso prometía considerables ventajas.

En primer lugar en el podsol las sustancias orgánicas del horizonte superior dispersa al estado coloidal, se movilizan intensamente a lo largo del perfil del suelo, que actúa a modo de columna cromatográfica, floculando más tarde y concentrándose de este modo en el horizonte B. Por esta causa las sustancias orgánicas de este horizonte son menos heterogeneas que las existentes en horizontes superiores en los que a la materia húmica propiamente dicha acompañan cantidades despreciables de materias no húmicas. Del horizonte B de los podsoles pueden extraerse fácilmente una gran parte de las sustancias orgánicas y especialmente grande el porcentaje de extracción de sustancias solubles en agua y

en ácidos, probablemente las fracciones de más bajo peso molecular de las que componen la materia húmica.

La materia húmica del horizonte B de los podsoles se encuentra sobre todo en forma de complejos insolubles de hierro y aluminio, pero por acción de agentes formados de complejos se pueden eliminar estos cationes y los compuestos coloreados solubilizarse en agua y en ácidos. Asimismo a bajos valores de pH se pueden también romper los complejos y extraerse incluso con ácidos diluidos, la materia húmica del suelo soluble en agua y en ácidos.

En nuestro estudio hemos empleado la fracción soluble en ácidos obtenida por extracción con ácido clorhídrico 1 N, extracción que según Dubach y Mehta (22) no altera las moléculas de los ácidos fúlvicos, como se ha comprobado al menos por estudio de algunas propiedades, como solubilidad, peso molecular, densidad óptica, etc. Se evitan de este modo los inconvenientes de la extracción con hidróxido sódico, que si bien extrae una mayor cantidad de materia orgánica, puede dar lugar a una profunda alteración de la misma por autoxidación y por fenómenos de polimerización y despolimerización.

Por haber elegido el diborano como agente reductor y por la solubilidad de esta sustancia en tetrahidrofurano, hemos utilizado solamente la fracción de ácidos fúlvicos soluble en dicho disolvente.

Se ha especulado con frecuencia sobre el hecho de que los ácidos fúlvicos representan una fracción intermedia en el proceso de humificación de las sustancias orgánicas del suelo. Por ello nos ha parecido interesante observar ese proceso de humificación, escogiendo para ello una serie de fracciones que por su peso molecular se encuentran comprendidas entre los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos. Estas frac-

ciones se han clasificado según su peso molecular y se obtuvieron por sucesivas dializaciones de la fracción de materia húmica extraíble con ácido. En las diversas fracciones así separadas se han estudiado propiedades tales como solubilidad, densidad óptica, peso molecular, análisis elemental, etc. encontrándose que pueden ser perfectamente clasificadas entre los ácidos fúlvicos y húmicos.

Por último se ha estudiado también los ácidos húmicos pardos del horizonte B del mismo podsol, tras haber extraído los ácidos fúlvicos y después de un pretratamiento del suelo con una mezcla de ácido clorhídrico: ácido fluorhídrico (1:1) ambos 1 N.

2.1.2 Suelo empleado

El podsol, la materia húmica de cuyo horizonte B fué empleada para nuestro estudio, tenía las siguientes características:

Situación: Nante (Canton Tesino, Suiza).

Precipitación anual media: 2170 mm

Temperatura media anual: 2,3 ° C

Relieve: montañoso

Altura sobre el nivel del mar: 1750 m

Declive: 40 %

Exposición: NNE

Roca madre: pizarra

Vegetación: Rhododendro-Vaccinietum extrasilvaticum

Horizonte B_h:

pH: 4,2

contenido en calcio: 0,0 %

Carbono orgánico: 9,6 %

relación C/N : 40

Como una parte de la materia no húmica, por ejemplo, lignina, polisacáridos, hidratos de carbono etc. se encuentra en el suelo en forma de microorganismos, restos de pequeños animales, raíces, etc. es necesario, antes de proceder a la extracción del suelo, eliminar todas estas impurezas que en la fracción fina se encuentran en gran cantidad. Esta separación se realiza por métodos físicos y antes de la extracción de la materia húmica.

Para la obtención del suelo libre de raíces y otras impurezas, se aplicó el método de Roulet y colaboradores (63). Para ello el suelo se muele a mano y se pasa a través de un tamiz de 2 mm de malla. Se deja secar al aire durante algunos días y se agitó posteriormente en un gran frasco de polietileno, con agua, con el fin de realizar una buena dis-

persión.

La suspensión de suelo se lleva luego al aparato de separación que consiste en un recipiente de cobre en forma de cono invertido ($h=60$ cm, $r=20$ cm) y cuyo vértice, cortado a unos 4 cm, deja una abertura que se puede obstruir con un tapón de goma fuertemente sujeto. En la parte lateral del cono se encuentran dos vertederos situados a 13,5 cm y 27,5 cm, respectivamente, del vértice. A lo largo del eje del cono penetra un tubo de acero para entrada del agua cuya altura respecto del vértice puede variarse a voluntad. La parte final del tubo se encuentra afilada con el fin de aumentar la velocidad de salida del agua.

Se introduce la suspensión del suelo en el aparato descrito y se deja entrar agua a presión por el tubo indicado a razón de unos dos litros por minuto. El suelo se agita con la corriente de agua y las partículas se extraen por los vertederos laterales según su tamaño cada 10 minutos, hasta que el agua sale completamente clara. La suspensión de suelo que sale por los vertederos pasa a través de un tamiz de 0,2 mm de malla y luego por otro de 0,1 mm. recogiendo finalmente en un gran recipiente. De aquí se pasa nuevamente a un tamiz de 0,06 mm. de malla agitado mecánicamente. La suspensión de suelo que pasa a través de este último tamiz se recoge en un recipiente donde se adiciona una solución de cloruro cálcico con el fin de ayudar a la rápida sedimentación. Se sifona el agua y el suelo es secado a alto vacío y baja temperatura.

Mediante observación al microscopio se encuentra que esta fracción fina del suelo se halla libre de restos de raíces, microorganismos y restos de pequeños animales. Un análisis de carbono indica que contiene un 65 % del carbono total del suelo.

2.1.3. Extracción de los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos pardos y fracción dializables.

Una vez la fracción fina del suelo obtenido del modo indicado, libres ya de restos orgánicos no húmicos, se agita en un frasco de polietileno con una solución de ácido clorhídrico 1 N durante 24 horas; se centrifuga y se repite esta operación hasta que los extractos son debilmente coloreados. Se unen todos los extractos y se centrifuga en una ultracentrífuga (27.000 r.p.m.) para eliminar las pequeñas partículas de arcilla. A la solución ácida se añaden entonces algunos ml. de cloruro férrico y se lleva a pH 4 con hidróxido sódico 5 N, precipitando la sal férrica de los ácidos fúlvicos que se separa por centrifugación.

Los ácidos fúlvicos así obtenidos se introducen en una bolsa de celofan y se dializan durante algunos días hasta quedar libres de cloruros. Posteriormente se agitan con resina cambiadora de cationes (Dowex 50) hasta llevar los ácidos fúlvicos a la forma H^+ , separando posteriormente la resina de los ácidos fúlvicos por filtración. Después de esta operación los ácidos fúlvicos, en solución, se percolan a través de una columna de cambio aniónica, (Dowex 2), con el fin de eliminar los restos de cloruros. El agua se destila entonces en un destilador rotatorio a vacío.

Como en nuestros trabajos posteriores necesitábamos una fracción soluble en tetrahidrofurano, los ácidos fúlvicos así obtenidos, se introdujeron en un aparato Soxhlet y se extrajeron con dicho disolvente durante 24 horas. La solución se concentró hasta unos pocos ml. y se precipitó en eter (razón 1:9); se disolvió nuevamente en tetrahidrofurano y se reprecipitaron de nuevo los ácidos fúlvicos con eter, secando finalmente a vacío.

Para la obtención de los ácidos húmicos pardos, 5 Kg. de suelo (separadas todas las raíces, restos de animales,

etc. por el método explicado anteriormente) se trataron con ácido clorhídrico 1 N durante algunos días, agitando, dejando sedimentar y sifonando cada día, y repitiendo este proceso hasta que los extractos eran debilmente coloreados. Todos los extractos se reunieron y se aprovecharon para la obtención de los ácidos fúlvicos ya mencionados anteriormente.

El suelo restante se trató con ácido fluorhídrico 1 N durante algunos días y se lavó luego varias veces con agua. Tras este tratamiento se adicionó hidróxido sódico y se ajustó la suspensión a pH 7, dejando estar algunos días, extrayendo cada día y adicionando de nuevo hidróxido sódico hasta que los extractos eran debilmente coloreados. Se reunieron todos los extractos y se trató entonces el suelo con hidróxido sódico 0,5 N, del mismo modo ya indicado, es decir hasta tener extractos muy debilmente coloreados. Estos extractos se unieron a los anteriores y se acidificaron, precipitándose así los ácidos húmicos. Estos fueron redisolu- tos y precipitados varias veces disolviendolos por último en poca cantidad de una solución de hidróxido sódico. A esta última solución se adicionó una solución 2 M de cloruro sódico, dejándola estar durante algún tiempo y centrifugándose posteriormente con una ultracentrífuga (27.000 r.p.m.) obteniéndose un precipitado de ácidos húmicos grises y quedándose en solución los ácidos húmicos pardos. Se repitió varias veces la adición de solución de cloruro sódico 2 M, hasta que no se obtuvo ningún precipitado más. Los ácidos húmicos grises así precipitados no fueron utilizados.

Los ácidos húmicos pardos en solución se precipitaron entonces con ácido clorhídrico 1 N, se separaron por centrifugación, y se dializaron en un saco de celofan, cambiándose diariamente el agua, hasta que estuvieran ausente de cloruros. Los ácidos húmicos pardos se secaron con un evaporador rotato-

rio a vacío, se disolvieron en poca cantidad de hidróxido sódico a pH 7, se volvieron a precipitar con ácido clorhídrico algunas veces con el fin de eliminar el ácido silícico, que pudiera haber, y se dializaron por último hasta quedar libres de cloruros.

Para la obtención de las fracciones dializables D_1 , el suelo fué sometido a todos los pretratamientos ya indicados y se extrajo con ácido clorhídrico de la forma mencionada. Una vez obtenidos los ácidos fúlvicos libres, se introdujeron en una membrana de celofán y se dializaron regociéndose periódicamente las aguas de dialización que contenían las fracciones dializables. Estas fueron independientemente secadas a vacío en un destilador rotatorio y cada una de ellas disuelta en poca cantidad de agua y secada a alto vacío y baja temperatura. Debido a que las cantidades obtenidas fueron muy diferentes y a que algunas fracciones se consiguió solo una pequeña cantidad, no se estudiaron posteriormente sino las denominadas D_2 , D_4 , D_7 , D_{10} , D_{12} y D_{13} .

2.1.4 Consideraciones teóricas sobre el diborano

Aun que en nuestras experiencias hemos empleado diversos agentes reductores, la mayor parte del trabajo se ha realizado con diborano.

Aunque los hidruros de boro se conocen desde hace tiempo, el conocimiento de la constitución y propiedades de estas sustancias es relativamente reciente.

Se producen en la descomposición ácida de ciertos boruros y forman un grupo importante de compuestos cuya constitución ha planteado uno de los problemas más interesantes en la teoría de la valencia y cuyas características generales son olor nauseabundo, fácil oxidabilidad, arder con llama verde, gran calor de combustión, liberar boro por descomposición al calor y ser fuertemente reductores.

Stock (81) realizó el estudio sistemático de estos hidruros revelando nuevas técnicas para la determinación de sus características físicas y químicas, extendidas más tarde a grupos de compuestos similares.

El compuesto más interesante de la serie de los boranos es sin duda el diborano, que en la preparación general se obtiene en mayor cantidad y que sirve a su vez de material de partida para la obtención de los restantes.

Schlesinger, H., Brown, H. y colaboradores (71) desarrollaron un método para la obtención de diborano por descargas eléctricas en una mezcla de hidrógeno y tribromuro de boro.

Sin embargo la observada actividad del diborano y su facilidad para reaccionar con diversos compuestos orgánicos e inorgánicos, determinaron la necesidad de producir esta sustancia de un modo más adecuado y en mayor cantidad. Schlesinger y Brown (72) obtuvieron diborano mediante la reacción de diversos hidruros de metales alcalinos con etileterato de

trifluoruro de boro, pero el aparato empleado era aun muy complicado y se requería mucho tiempo para la obtención y purificación del compuesto.

Posteriormente los autores citados, descubrieron que el borohidruro de litio reaccionaba con el etileterato de trifluoruro de boro para dar lugar a diborano, pero debido al alto coste de los materiales originales, este procedimiento no era rentable. Por último se comprobó que el borohidruro de sodio daba también buenos rendimientos en esta reacción y que su empleo no era costoso ni la práctica de este procedimiento presentaba muchas dificultades.

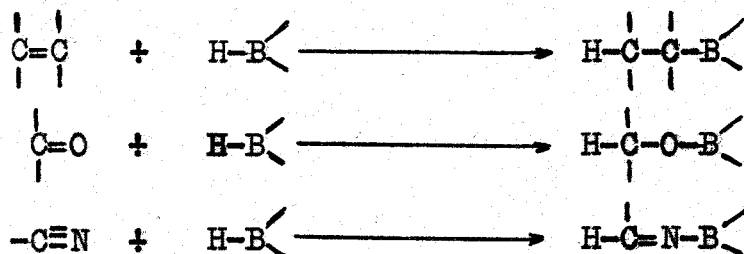
Hace algún tiempo se comprobó que el diborano reaccionaba rápidamente con aldehidos y cetonas simples, tal como acetaldehido y acetona para producir dialkoxyborano (6). Posteriormente estas sustancias fueron hidrolizadas dando lugar a la formación de ácido bórico y el correspondiente alcohol. Se dedujo, por ello, que el procedimiento para la reducción de los grupos carbonilos ofrecía una ruta prometedora.

Pero en la época de estas investigaciones el diborano se producía solo en pequeñas cantidades, por lo que el proceso solo tenía un interés teórico. Al mismo tiempo el descubrimiento de los borohidruros alcalinos é hidruros de aluminio, hizo posible el empleo de otros caminos para tales reducciones (56, 57, 13.); por lo que aunque más tarde se obtuvo diborano por otros métodos y en mayor cantidad, se hicieron pocas tentativas para su empleo en estas reducciones (73, 7), ya que los procedimientos que utilizaban los borohidruros de metales alcalinos e hidruros de aluminio eran más simple.

Sin embargo, un examen cuidadoso de datos obtenidos reveló interesantes diferencias entre las reducciones con

borohidruros y diborano. Por ejemplo, el diborano no reduce al cloral, mientras que el borohidruro de sodio reduce este aldehído con gran facilidad. De la misma manera el cloruro de acetilo no reacciona con el diborano bajo condiciones normales, mientras que es rápidamente reducido por el borohidruro de sodio.

La adición del enlace boro-hidrógeno del diborano a diferentes enlaces parece ser una reacción muy general. Así la adición al doble y triple enlace C-C, ocurre a la temperatura ordinaria con gran facilidad. La adición al enlace C=O en aldehídos y cetonas era también conocida desde hace tiempo. Estas uniones se pueden resumir del modo siguiente:



Consecuentemente parece ser que la adición del enlace H-B del diborano a uniones múltiples del tipo expuesto, es una reacción tan general como la adición de hidrógeno a tales enlaces. Difiere de esta última reacción en la facilidad con que el diborano se adiciona a tales enlaces mientras que el hidrógeno requiere comúnmente la acción catalítica de metales. Se ha sugerido el término general de hidroboración para esta importante reacción general de adición.

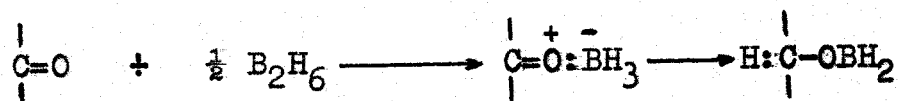
A partir de estos primeros estudios con diborano, se ha estudiado la reducción de un gran número de sustancias, algunas de las cuales se detallan a continuación:

<u>Grupos funcionales</u>	<u>moles hidruro consumidos/ mol sustancia</u>	<u>Producto final</u>	<u>Observaciones</u>
Alcohol	1	Alcohol	Produce 1 mol de H ₂
Aldehido	1	Alcohol	reacción rápida
Cetonas	1	Alcohol	idem
Cloruros de ácidos	0		no reaccionan
Ester	2	Alcohol	reacción lenta
Lactona	2	Glicol	idem
Acido carboxílico	3	Alcohol	reacción rápida. Produce 1 mol hidrógeno
Sal de ácido carboxílico	0		no reacciona
Epoxido	1	Alcohol	reacción lenta
Amida	2		produce 2 moles de H ₂
Nitrilo	2	Amina	reacción rápida
Nitroderivados	0		no reacciona
Azo-derivados	2	Amina	reacción rápida
Sulfona	0		no reacciona
Haluros aromáticos	0		idem
Hidruros aromáticos	0		idem

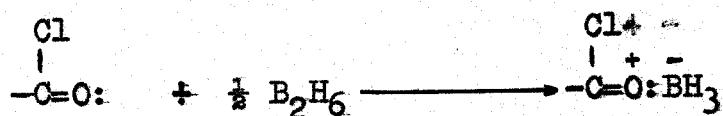
El diborano exhibe un número bastante grande de diferencias interesantes al ser comparados con los borohidruros de los metales alcalinos.

Así los nitrilos no son reducidos por los borohidruros mientras que son rápidamente convertidos en aminas por acción del diborano a la temperatura ambiente. Similarmente los ácidos carboxílicos son considerados como relativamente resistentes a los agentes reductores. Sin embargo el diborano convierte estos compuestos en alcoholes con notable rapidez.

Se comprobó que los grupos carbonilos de los aldehidos y cetonas reaccionaban rápidamente con el diborano, mientras que los grupos carbonilos del cloral y de los cloruros de ácidos eran inertes a este hidruro. Se observó al mismo tiempo que aquellos aldehidos y cetonas que reaccionaban fácilmente con el diborano formaban también compuestos de adición muy estables con el trifluoruro de boro, mientras que el cloral y el cloruro de acetilo adicionan este ácido tipo Lewis con gran dificultad y a bajas temperaturas. Por ello se ha sugerido que la primera etapa de reacción entre el diborano y el grupo carbonilo implica una reacción ácido-base, con adición de borano al átomo de oxígeno, seguida luego por una transferencia de hidrógeno del átomo de boro al de carbono.



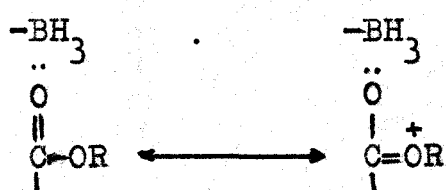
Sobre esta base, la inercia del cloruro de acetilo y el cloral frente al diborano se atribuye a las decrecientes propiedades básicas del átomo de oxígeno del grupo carbonilo, debido al gran efecto inductivo del átomo de halógeno sustituyente



Es de notar que ambos compuesto, cloruro de acetilo y cloral, reaccionan facilmente con el borohidruro sódico. Parece pues claro que la deficiencia de electrones inducida por el cloruro sustituyente, inhibe la acción de ácido tipo Lewis (diborano) pero facilita el ataque por el ion nucleofílico del borohidruro.

En otras palabras, el diborano es un ácido tipo Lewis, que funciona mejor como agente reductor al atacar a grupos de alta densidad de carga, en tanto que el borohidruro es una base tipo Lewis, que actua preferentemente sobre grupos de baja densidad electrónica.

Dos circunstancias intervienen probablemente en la pequeña velocidad de reacción del diborano con los ésteres carboxílicos. En primer lugar la adición de la molécula de diborano al átomo de oxígeno del grupo alquilo. Segundo, la transferencia del átomo de hidrógeno desde el boro al oxígeno será obstaculizada por la estabilización del grupo carbonilo debido a la resonancia con el átomo del oxígeno del grupo alquilo.



Por el contrario es notable la facilidad de reacción entre el diborano y los ácidos carboxílicos. La primera etapa de reacción parece ser la formación de un triacilborano



que se reduce posteriormente al ser tratado con más diborano. Es de hacer notar que el grupo carboxílico en este estado intermedio es tan activo que se puede reducir tambien por acción del borohidruro sódico.

La interpretación de esta última reacción es como sigue: la deficiencia electrónica del átomo de boro en el triacilborano ejerce una fuerte demanda de un par de electrones del oxígeno acilo, resonancia que implica una interacción de este átomo de oxígeno con el de boro muy superior a la resonancia usual con el grupo carbonilo



Con ello el grupo carbonilo en los triacilboranos se asemeja más al de los aldehidos y cetonas que al grupo carbonilo de los ésteres (g).

A la vista de lo expuesto sobre el diborano, encontramos que esta sustancia era el agente ideal para tratar de reducir la fracción de los ácidos fúlvicos y que un adecuado uso de este reactivo podría conducir a resultados interesantes. Sus fáciles condiciones de empleo, a temperatura ordinaria, etc., la no existencia de reacciones laterales, así como la posibilidad de investigar al mismo tiempo varios grupos funcionales tales como carboxilos, grupo carbonilo en aldehidos y cetonas, dobles enlaces olefínicos, etc. nos indujeron definitivamente a elegir esta sustancia para nuestro trabajo de elucidar algunos aspectos de la constitución de los ácidos fúlvicos.

2.1.5 Obtención del diborano

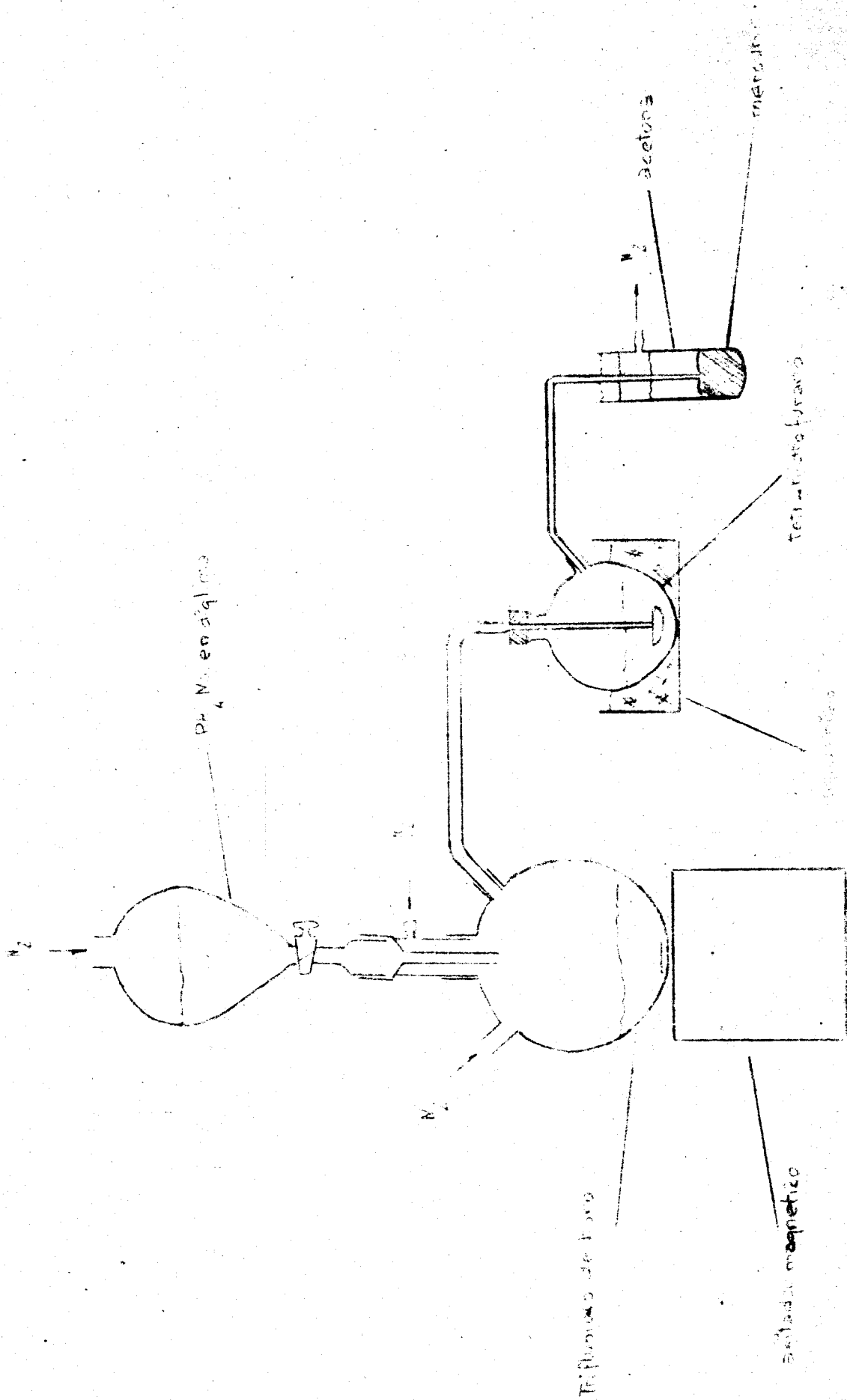
Los reactivos a utilizar en esta reacción deben ser recientemente preparados.

El tetrahidrofurano se destiló primero simplemente, añadiendo después con cuidado algo de hidruro de aluminio y litio hasta que cesa el desprendimiento de hidrógeno, dejándolo estar algunas horas y volviendo a destilar de nuevo. El tetrahidrofurano así purificado se conserva en un frasco oscuro, con hilos de sodio, con el fin de evitar la formación de peróxidos.

La diglima (éter dimetílico del dietilenglicol) se trató primero con hidruro cálcico durante 48 horas, destilándose luego en vacío.

El etileterato de trifluoruro de boro se destiló a vacío con algunos gramos de hidruro cálcico, adicionando previamente éter seco con el fin de asegurar la formación del etileterato. El producto destilado se conserva en un frasco de color oscuro y en atmósfera de nitrógeno.

Para la obtención del diborano se empleó el aparato que se muestra en la fig. 25 que se compone de un matraz de tres bocas; en la central de las cuales se ajusta un embudo de llave con presión igualada. Por otra de las bocas laterales se introduce nitrógeno, mientras que por la tercera sale la mezcla de este gas y del diborano obtenido. Ambos gases se llevan luego a un matraz de dos bocas que contiene tetrahidrofurano, quedando el diborano retenido. El nitrógeno y algo de diborano que no ha sido absorbido por el tetrahidrofurano se llevan a un tubo de ensayo, ancho con tubuladura lateral que contiene mercurio en su fondo (válvula) y unos cm^3 de acetona. Esta última sirve para eliminar el diborano que pudiese salir ya que este reacciona rápidamente con la acetona para formar diisopropoxyborano.



Se utiliza un agitador magnético con el fin de mezclar bien los productos de reacción.

Es esencial que el aparato esté totalmente limpio y exento de humedad, para lo cual cada una de sus partes es lavada cuidadosamente y secada después dejándolo estar durante algunas horas a 100 ° C, montándose a continuación el aparato mientras se pasa desde el comienzo una corriente de nitrógeno seco. Una vez instalado, y sin adicionar los reactivos, se flamea con la llama de un mechero, con el fin de eliminar la humedad, pasando incesantemente nitrógeno y dejando enfriar.

Se prepara una solución 1 molar de borohidruro sódico en diglima, disolviendo 7,6 gr de borohidruro sódico en 200 ml de diglima, agitandola durante algunas horas, e introduciendola en el embudo de decantación. En el matraz de tres bocas se colocan 50 ml de etileterato de trifluoruro de boro; y en el matraz de absorción 120 ml de tetrahidrofurano.

Se deja gotear lentamente la solución de borohidruro sódico sobre el trifluoruro de boro, produciendose inmediatamente la reacción



El diborano producido es arrastrado por el nitrógeno y queda absorbido por disolución en el tetrahidrofurano. Al finalizar el goteo de la solución de borohidruro sódico, se calienta durante una media hora el matraz de reacción, con un baño de aceite a 60-70 ° C, con el fin de completar la reacción.

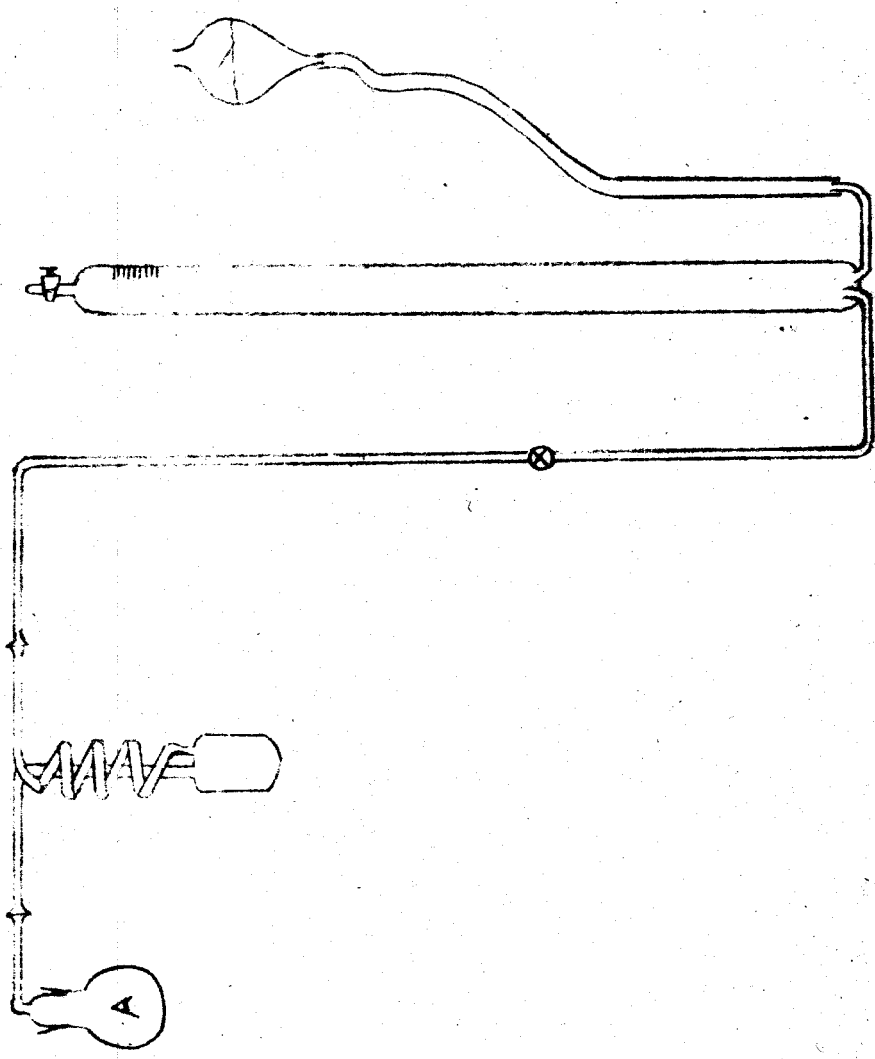
Con las cantidades indicadas se obtiene una solución de aproximadamente 1 M de diborano que puede conservarse en un refrigerador sin pérdida de actividad durante unos dos meses.

2.1.6 Determinación del hidrógeno activo con diborano

Se ha utilizado el aparato que se muestra en la fig. nº . Consiste de un matraz con tubuladura lateral, al que se ajusta un tapon de goma especial que puede ser atravesado por una aguja de jeringa hipodérmica. A continuación se encuentra un refrigerante que tiene como fin condensar los vapores de agua, para que estos no lleguen al matraz de reacción y reaccionen con el diborano allí introducido, ya que esto originaría un desprendimiento de hidrógeno que no correspondería al desarrollado por la sustancia a investigar. Por último se encuentra una bureta, calibrada desde 1 hasta 150 cm^3 (pudiéndose apreciar lecturas del orden de $1/4$ de cm^3) y recipiente de nivelación unido por una goma a la bureta de lectura.

La sustancia a determinar, perfectamente secada, se pesa en el interior del matraz. Por medio de una pipeta, se añade a esta una cantidad determinada de tetrahidrofurano. Inmediatamente se une el matraz al aparato de medida y se espera algún tiempo hasta que el nivel del agua del tubo de entrada a la bureta, permanece constante. En este momento y por medio de una jeringa hipodérmica, se introduce en el matraz de reacción y a través del tapon de goma, una cantidad determinada de diborano disuelto en tetrahidrofurano. Si la reacción es homogénea, es decir, si la sustancia a investigar está disuelta en tetrahidrofurano, el desprendimiento de hidrógeno es inmediato, completándose en un periodo de tiempo comprendido entre 2 y 5 minutos. Se nivela de nuevo el nivel de agua hasta la altura inicial, procediéndose luego a la lectura en la bureta.

En el caso en que la sustancia a investigar no sea soluble en tetrahidrofurano o cualquier otro disolvente inac-



tivo al diborano, se procede del mismo modo indicado, pero suspendiendo la sustancia en tetrahidrofurano o trabajando sobre el sólido sin adición de disolvente.

En las mismas condiciones descritas se efectúa un ensayo en blanco, cuyo resultado se resta del valor obtenido con la sustancia a investigar. El volumen final obtenido de hidrógeno se refiere luego a condiciones normales (0 ° C y 760 mm de presión).

Como en el caso de los ácidos fúlvicos y de las fracciones dializables, la reacción terminaba inmediatamente sin que hubiera más desprendimiento de hidrógeno (debido tal vez a una absorción del diborano por los ácidos fúlvicos) y como por otra parte en prueba en blanco, a causa de la gran presión de vapor del diborano, no se obtenía un nivel constante sino después de largo tiempo, por lo que los valores obtenidos no eran reproducibles, se siguió otro procedimiento ligeramente diferente, suprimiendo el ensayo en blanco.

En tres matraces distintos, se pesaron cantidades diferentes de la sustancia a investigar, añadiendo a cada matraz 5 ml de tetrahidrofurano y 1 ml de diborano disuelto en tetrahidrofurano. Los volúmenes obtenidos de hidrógeno se representaron luego graficamente frente a la sustancia de partida, obteniéndose así una línea recta. La diferencia entre cualquiera de dos de los puntos indica entonces la cantidad de hidrógeno desarrollada por una cantidad de sustancia igual a la diferencia de peso a que dichos puntos corresponden.

Los ácidos húmicos pardos así como las fracciones D₁₀, D₁₂ y D₁₃ fueron disueltos en dimetilformamida, al no ser solubles en tetrahidrofurano. Aunque la dimetilformamida no es un disolvente inactivo frente al diborano, ya que tiene un grupo carbonilo reducible, como la velocidad de reacción del desarrollo de hidrógeno es mayor que la de reducción del grupo

carbonilo, se puede medir el hidrógeno desarrollado aunque usando en este caso una mayor cantidad de diborano, generalmente 2 ml. En este caso se procedió de las dos maneras antes citados, con y sin ensayo en blanco, obteniendo resultados perfectamente coincidentes.

2.1.7. Reducción con diborano

Se realiza del modo siguiente: 500 mgr de ácidos fúlvicos se disuelven en 10 ml de tetrahidrofurano, adicionando inmediatamente 5 ml de una solución de diborano en el mismo disolvente. Con ello se desprende inmediatamente una cierta cantidad de hidrógeno apareciendo a continuación un precipitado en el matraz de reacción. Se agita luego la masa fuertemente con un agitador magnético hasta que el precipitado se divide finamente, continuando la reacción. En los primeros ensayos se dejó estar el matraz de reacción a la luz, pipeteando cada día unas cuantas gotas del diborano sobrenadante y echandolas sobre agua, con el fin de comprobar su actividad. Cuando esta era nula, se decantaba cuidadosamente y se adicionaba nuevo diborano. Esta operación fué necesario efectuarla cada dos o tres días. En otros ensayos posteriores, el matraz de reacción se conservó al abrigo de la luz en un desecador, de color topacio. Con ello solo fué necesaria realizar una adición de diborano al comienzo de la operación conservando aquel su actividad durante un mes, al tiempo que la reducción tenía lugar en mejores condiciones.

2.1.8 Consideraciones sobre el BH_4Na

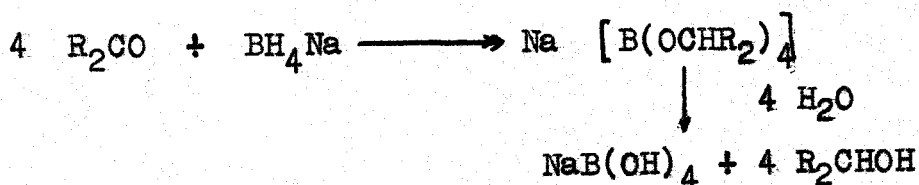
Como se indicó en otro lugar no puede emplearse el diborano en la reducción de grupos carbonilo por dificultades técnicas, por lo que usamos para este fin el borohidruro de sodio.

La gran ventaja de usar este compuesto estriba en la gran variedad de disolventes que pueden emplearse, a diferencia de lo que ocurre con el diborano, hidruro de aluminio y litio, etc. Por esta causa el borohidruro sódico ha sido muy usado para reducir una gran variedad de sustancias. Dentro de esta clase de agentes reductores, es, sin embargo, el que presenta menor poder reductor en lo que a variedad de grupos se refiere ya que solo el grupo carbonilo de aldehidos y cetonas puede ser convenientemente reducido. El comportamiento del compuesto a este respecto puede resumirse del modo siguiente:

Acción del BH_4Na sobre diversos compuestos:

Aldehidos	→	alcoholes
Cetonas	→	alcoholes
Clor. de ácido	→	no reaccionan
Lactonas	→	no reaccionan
Oxidos	→	no reaccionan
Esteres	→	no reaccionan
Ac. carboxílicos	→	no se reducen
Sales, nitrilos y olefinas	} →	no reaccionan

La estequiometria de la reacción, en el caso de grupo carbonilo en aldehidos y cetonas es como sigue



El agua es un excelente disolvente para el borohidru-
ro y es preferible a otros agentes si la sustancia a reducir
es también soluble en dicho medio. Sin embargo la mayoría
de los aldehidos y cetonas no son solubles en agua, sino en
disolventes orgánicos, por lo que en estos casos la reacción
debe realizarse en otro medio, siendo muy apropiado el dioxana
y la piridina en los que el borohidruro sódico es estable
indefinidamente. Es de destacar, sin embargo, que la reac-
ción no tiene lugar en ausencia de agua (o alcoholes de bajo
peso molecular) ya que el agua toma parte en el proceso como
se indicó anteriormente.

Debido a la hidrolisis del borohidruro sódico en me-
dio ácido o neutro, es preferible usar soluciones tan alcali-
nas como sean posibles como disolventes de dicha sustancia.

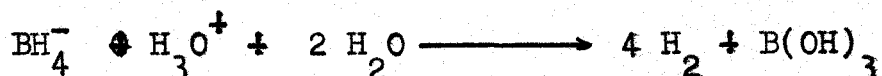
La reacción borohidruro-carbonilo, es dependiente
del tiempo y de la concentración. Para una buena reducción
se emplean generalmente concentraciones del orden de 0.05
molar con un tiempo de reacción de 2 horas.

La temperatura es otra de las condiciones que afec-
tan la hidrolisis del borohidruro sódico. A bajas temperaturas
es mayor la estabilidad del compuesto, pero es menor la
posibilidad de reducir el grupo carbonilo por lo que no pue-
den emplearse temperaturas demasiado bajas. La reacción
transcurre bien en las proximidades de la temperatura ambien-
te (20-30 ° C). En estas condiciones la hidrolisis del boro-
hidruro sódico es muy pequeña y la reducción del grupo
carbonilo es relativamente suave.

Una cuestión muy a tener en cuenta es que la hidro-
lisis del reactivo puede ser catalizada por ciertas sales
metálicas y algunas otras impurezas, por lo que es aconse-
jable trabajar con productos de la máxima calidad.

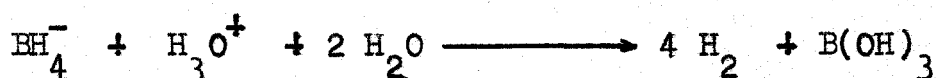
Para la determinación cuantitativa del borohidruro sódico existen diversos métodos que se detallan a continuación.

a) Método basado en el desprendimiento de hidrógeno. Este método está basado en la hidrólisis de la solución de borohidruro sódico al adicionar un ácido, desprendiéndose hidrógeno según la ecuación siguiente

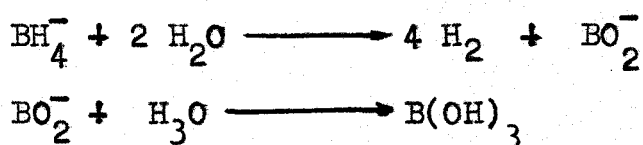


La cantidad de borohidruro presente se calcula a partir del volumen de hidrógeno desarrollado. Este último puede ser medido manométrica ó volumétricamente. Algun error puede producirse por el hecho de que no todo el gas desarrollado sea hidrógeno, sino que haya algo de CO_2 , ya que una impureza corriente del reactivo es el carbonato sódico. Sin embargo, efectuando una prueba en blanco se elimina esta fuente de error.

b) Método basado en valoración ácido-base (16).— La valoración del borohidruro con ácido se puede expresar según la siguiente ecuación



Esta ecuación parece sugerir que el ión básico borohidruro sería valorable directamente con un ácido fuerte para dar lugar a la formación del ácido bórico. Sin embargo no ocurre así, ya que la hidrólisis del borohidruro se completa antes de que se alcance el punto final de la valoración. Por otra parte se cree que la mencionada ecuación transcurre en dos etapas



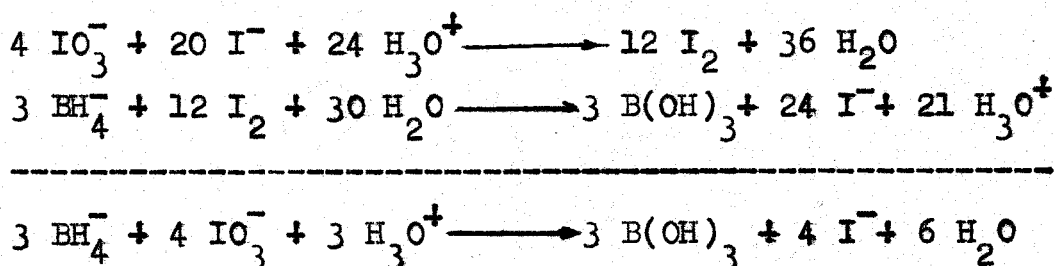
Por ello el método a seguir consiste en la valoración del ácido bórico formado, mediante la adición de manitol, y valoración posterior con un álcali, del complejo bórico-manitol.

Las impurezas, como borato sódico, dan lugar a errores en la aplicación de este método. El empleo de disolvente s orgánicos dificultan también la valoración final.

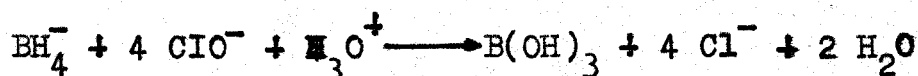
c) Método iodométrica (47).- Este método es rápido y seguro y permite la determinación cuantitativa del borohidruro sódico. Parece lógico creer que el borohidruro que es un agente reductor, reducirá al iodato potásico, que es un agente oxidante. El exceso de iodato se descompondría con ioduro potásico en medio ácido, valorándose el iodo formado con tiosulfato. La reacción sería



Sin embargo, se ha comprobado que la reacción no transcurre de este modo, sino que cuando se añade ácido para la formación del iodo y valoración de éste con tiosulfato, en ese momento en el que la reacción está en medio ácido, el borohidruro reacciona con el iodo liberado. La reacción transcurre en dos etapas



d) Método del hipoclorito (14).- El borohidruro sódico puede valorarse en medio buffer directamente con hipoclorito sódico usando rojo burdeos como indicador. La estequiometría de la reacción es como sigue

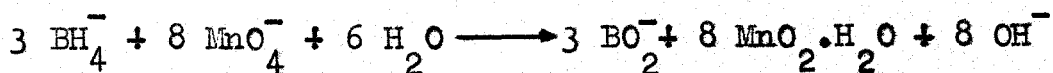


El pH de la solución es crítico durante la valoración: el óptimo se encuentra entre 9,6 y 10,3. A pH por encima de 10,3 la reacción es demasiado lenta, en tanto que por debajo de 9,6 la hidrólisis del borohidruro es demasiado rápida. El punto final de la valoración presenta alguna dificultad, ya que el color final depende de la cantidad de indicador utilizado,

Por ello en procedimientos Standard hay que utilizar siempre la misma cantidad de indicador.

e) Método de valoración potenciométrica.- Debido a las propiedades reductoras del borohidruro sódico, reacciona con agentes oxidantes, pudiéndose por ello determinar por medio de una reacción de oxido-reducción. El permanganato potásico, se puede utilizar y da valores muy reproducibles. Se añade un exceso de solución de permanganato, se acidifica, y se valora el exceso de permanganato con ácido oxálico.

La reacción es instantánea, pero una valoración directa basada en la decoloración del permanganato no puede ser utilizada, ya que la reacción se realiza en medio alcalino, en cuyo caso el dióxido de manganeso formado dificulta la apreciación del punto final. Es necesario por ello determinar el punto final potenciométricamente. La reacción transcurre de la manera siguiente



De los métodos aquí mencionados, escogimos el de la determinación volumétrica del hidrógeno tras la acidificación de la solución de borohidruro sódico. Las razones fueron, en primer lugar, su mayor rapidez, y en segundo lugar porque con ello era posible utilizar el mismo aparato empleado en la determinación del hidrógeno activo mediante la reacción con diborano.

Este método ha sido utilizado con éxito en la química de la lignina, para la determinación de los grupos carbonilo. Gierer y Söderberg (38) encontraron mediante los datos obtenidos a partir del consumo de borohidruro, que la lignina contenía 0,4 CO/OCH₃. Este trabajo fué revisado por Marton y colaboradores (54), que encontraron idénticos resultados al

aplicar el mismo método. Obtuvieron valores más altos cuando la reacción fué llevada a cabo con agitación de los productos

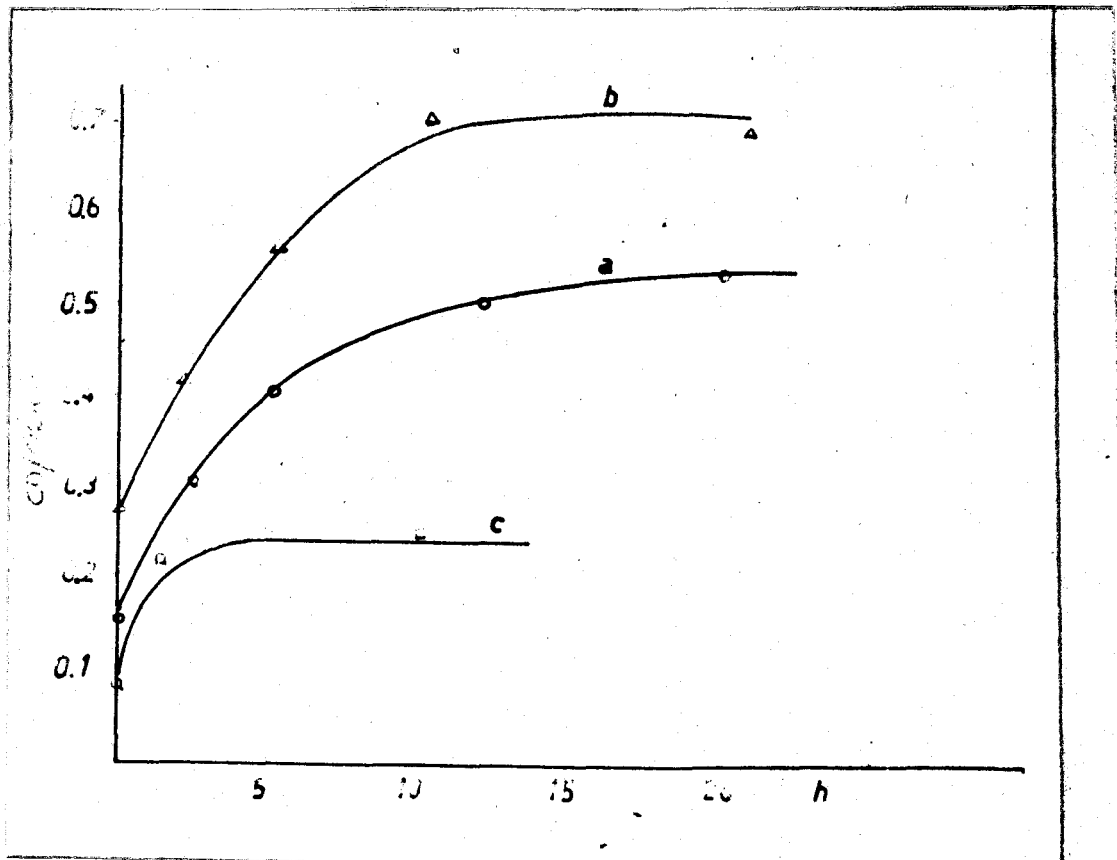


Fig. nº 2

Asimismo observaron que el punto final de la reacción no podía ser determinado al cabo de 5 horas (periodo utilizado por Gierer y Söderberg), puesto que el contenido en CO aumentaba con el tiempo de reacción (curvas a y b de la fig. 2) tanto con agitación como sin ella.

Puesto que el gas determinado al final de la reacción es una mezcla de aire é hidrógeno, parece posible que a la vista de tales resultados ocurriera una reacción entre el hidrógeno y alguno de los componentes del aire. Mediante diversos experimentos comprobaron que la mayor parte del consumo de hidrógeno, provenía de una reacción con el oxígeno del aire catalizada por la presencia de metales pesados, tales como Fe, Ni y Cr, los cuales, aunque en ínfimas cantidad, se encontraban presentes en la lignina.

Si el ensayo se lleva a cabo introduciendo en el aparato de medida nitrógeno o hidrógeno, los valores encontrados para el consumo de borohidruro sodico son más bajos. Valores del orden de 0,27-0,29 CO/OCH_3 se obtuvieron tras un periodo de reacción de dos horas. En contraste con los otros experimentos este valor permanece constante al aumentar el periodo de reacción (curva c de la fig 2ª)

2.1.9. Determinación del grupo carbonilo con borohidruro sodico

En sendos matraces con tubuladura lateral se pesan 50 mg de cada una de las fracciones a estudiar. Se disuelven en 2 ml de agua destilada (los ácidos húmicos pardos y los ácidos fúlvicos reducidos se suspenden solamente en agua, por no ser solubles en este medio, pero al neutralizar pasan a solución) y se adiciona NaOH 2 N para neutralizar los grupos ácidos, ya que en caso contrario se descompondría la solución de borohidruro sodico. Se adiciona luego 3 ml de una solución de ácido bórico (1 gr/100 ml de alcohol etílico) con el fin de estabilizar la solución de borohidruro; se cierra el matraz de reacción con un tapón de goma especial y se conecta al aparato de medida (análogo al utilizado para la determinación de hidrógeno activo con diborano). A través del tapón de goma y por medio de una aguja de inyectar, se introduce en el aparato una corriente de argón para eliminar el aire de su interior. Se pasa la corriente durante dos horas. Al cabo de ese tiempo se retira la aguja de inyectar y se ajusta a cero la bureta de medida.

Mediante una jeringa se introducen a través del tapón de goma 3 ml de una solución de borohidruro asodico (1 gr/100 ml de NaOH 0,1 N) y se dejan reaccionar con la sustancia durante dos horas.

este
 Tras ~~un~~ periodo de reacci3n se introducen en el sistema 2 ml de acido sulfurico 2 N, con el fin de descomponer el borohidruro sodico,recogi3ndose el hidrogeno producido en la bureta de medida.Al mismo tiempo y en identicas condiciones se efectua una pr3beba en blanco.La diferencia entre el hidrogeno producido por esta 3ltima y el de la reacci3n con la muestra a investigar,indica la cantidad de hidrogeno absorbida por la sustancia en estudio.

Los ml de hidrogeno absorbidos se llevan a condiciones normales y se calculan los miliequivalentes de CO mediante las igualdades siguientes:

$$1 \text{ ml de H}_2 \text{ absorbido} = 1,249 \text{ mg de CO} = 0,0446 \text{ meq CO}$$

2.1.10 Consideraciones sobre el AlLiH₄

Como el diborano reduce muy lentamente los acidos fulvicos,hemos ensayado tambi3n el m3todo cl3sico con el hidruro de aluminio y litio, AlLiH₄.

El hidruro de aluminio y litio,como el diborano posee la propiedad de atacar el grupo carbonilo asi como desarrollar hidrogeno por reacci3n con el hidrogeno activo de algunos grupos funcionales organicos.Se emplea por lo general en soluciones de eter etilico y raras veces en eteres de alto punto de ebullici3n.Normalmente la reacci3n transcurre con extraordinaria rapidez.La principal limitaci3n para el empleo de este hidruro en reacciones de reducci3n estriba en la perdida de material que se produce al intentar separar el producto reducido.

Los siguientes compuestos organicos pueden ser reducidos por el hidruro de aluminio y litio:

aldehidos \longrightarrow alcoholes
 cetonas \longrightarrow alcoholes
 cloruros de acidos \rightarrow alcoholes
 lactonas \longrightarrow alcoholes (glicoles)
 oxidos \longrightarrow alcoholes
 esteres \longrightarrow alcoholes
 ac. carboxilicos \rightarrow alcoholes
 nitrilos \longrightarrow aminas
 olefinas \longrightarrow no reaccionan

Los respectivos compuestos se encuentran ordenados segun su facilidad de reaccion con el hidruro.

En terminos generales, todo atomo de hidrogeno unido a un atomo de nitrogeno, oxigeno o azufre es hidrogeno activo respecto al hidruro de aluminio y litio, reaccionando con liberacion de un mol de hidrogeno y consumiendo un cuarto de mol del hidruro por hidrogeno activo. Estas reacciones son rapidas y completas, pero las sustancias a investigar deben de ser solubles en eter. Es una reaccion paralela a la bien conocida del ioduro de metilmagnesio (procedimiento de Zerewitinoff), pero existen diferencias con respecto a la reaccion con compuestos enolizables. En general la accion del hidruro de aluminio y litio es equivalente a la del reactivo de Grignard. Los valores varian con el disolvente en el caso de compuestos enolizables, pero se encuentran valores mas pequenos con el hidruro que con el reactivo de Grignard, debido quizas a que la reaccion es mas rapida con aquel y hay menos tiempo para que ocurra la enolizacion.

La reduccion de aldehidos y cetonas no presenta ninguna dificultad, y tampoco se presentan en la reduccion de epoxidos. Los esteres son facilmente reducidos a alcoholes; y forzando las condiciones (empleando largos periodos de tiempo y altas temperaturas) se puede llegar a hidrocarburos, aunque

2.1.11 Reducción con hidruro de aluminio y litio

Se disuelven 500 mg de ácidos fulvicos en 20 ml de tetrahidrofurano (destilado con hidruro de aluminio y litio) y se introducen en un matraz de tres bocas. Por una de las bocas laterales y con ayuda de un embudo de decantación provisto de llave, se introduce una suspensión de 2 gr de hidruro de aluminio y litio en 50 ml de tetrahidrofurano (previamente destilado también con el mismo hidruro). Al mismo tiempo por la otra boca lateral se introduce una corriente de nitrógeno, con el fin de realizar la reducción en ausencia de oxígeno. La boca central lleva unido un refrigerante. Se deja caer lentamente la suspensión del hidruro sobre los ácidos fulvicos mientras se agita por medio de un agitador magnético. Terminada la adición se deja el sistema en un baño de agua a 60 °C durante tres horas y posteriormente, durante igual tiempo a temperatura ambiente.

Al cabo de este tiempo se adiciona lentamente acetato de etilo con el fin de eliminar el hidruro de aluminio y litio no consumido y se agita con resina cambiadora de cationes (Dowex 50) durante un periodo de 24 horas. Por filtración se separa la resina de los ácidos fulvicos secando estos a vacío en un destilador rotatorio, suspendiéndolos luego en agua y secando de nuevo a alto vacío y baja temperatura.

Otra variante del método consistió en destruir el exceso de hidruro con una adición cuidadosa de ácido clorhídrico, estando sumergido el matraz de reacción en una mezcla de agua y hielo, con el fin de evitar una elevación excesiva de la temperatura. Una vez eliminado el hidruro, se añade más cantidad de ácido clorhídrico, lavando y centrifugando rápidamente varias veces. El precipitado resultante se agita con Dowex 50, se filtra, seca y suspende en agua, y se seca de nuevo a alto vacío y baja temperatura.

2.1.12 Metodos de acetilacion

Los metodos de acetilacion permiten la determinacion de alcoholes primarios y secundarios, fenoles y mercaptanes, y aminas primarias y secundarias. No todos los metodos de acetilacion son aptos para la determinacion de estos grupos funcionales y solo unos cuantos pueden usarse para el estudio de estructuras tales como pirroles, iminas y alcoholes terciarios (vease tabla 2). El radical adjunto al grupo funcional influye grandemente, por otra parte en la velocidad de acilacion y en la seguridad del metodo.

Varios son los procedimientos que se pueden emplear para determinar el hidrogeno acetilable.

a) Metodo de determinacion por separacion del producto acetilado.- En este metodo los productos acetilados insolubles en agua se separan de la mezcla acetilante por adicion de **esta** agente y lavado posterior.

Los procedimientos para la determinacion del grupo acetilo en el producto obtenido se pueden dividir en tres grupos

- 1) determinacion del agente de saponificacion, es decir, hidrolisis alcalina y valoracion del exceso de alcali no utilizado,
- 2) hidrolisis acida o alcalina seguida por la separacion del acido acetico liberado por destilacion o filtracion,
- 3) transesterificacion a etil o metil acetato, posterior saponificacion y determinacion del acetico liberado.

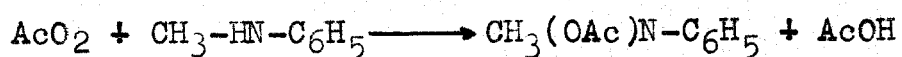
En la aplicacion de cualquiera de estos tres metodos para determinar el grupo acetilo, es conveniente realizar una prueba en la muestra original, ya que la presencia de ester puede dar lugar a falsos resultados.

Generalmente este metodo no se utiliza para analisis de rutina, ya que consume mucho tiempo. Los errores que se pueden presentar son los siguientes: eliminacion incompleta del agente acetilante por lavados defectuosos; hidrolisis de los esteres

por excesivos lavados; presencia de ácidos grasos que reaccionan con el agente acetilante para dar lugar a anhídridos que son relativamente estables a las aguas de separación y lavados pero que son hidrolizados durante la determinación de los grupos acetilo; y por último los errores que acompañan a la determinación del grupo acetilo.

b) Metodo del exceso de agente acetilante .-Este metodo implica el uso de anhídridos de ácidos o cloruros de ácidos como agentes acetilantes. Después que la reacción de acetilación se completa, el exceso de agente se hidroliza con agua y la solución resultante se valora con alcali. Se debe de hacer una corrección si la muestra original tiene grupos ácidos.

Una variante de este metodo consiste en adicionar, después del periodo de acetilación, una cantidad determinada de N-metil-anilina, y valorar el exceso de esta (que no ha reaccionado con el exceso de anhídrido) con ácido perclórico. La reacción es como sigue:



c) Metodo de determinación del ácido volátil formado .- Este metodo aplica específicamente el uso de cloruros de ácidos de alto peso molecular. La reacción es como sigue:



el cloruro de hidrógeno se destila de la mezcla y se conduce mediante aire o nitrógeno dentro de agua o alcali, valorándose la solución resultante con alcali o ácido respectivamente.

El hidrogeno acetilable es equivalente al cloruro de hidrogeno determinado.

d) Metodo de determinacion del agua.- Este metodo está basado en la determinación de la cantidad de agua formada durante el proceso de acetilación, con el reactivo de Karl Fischer. El punto final se puede determinar o visualmente o por metodos electrometricos.

Para la aplicacion de este metodo existen dos procedimientos:

1 d) acetilación con acido acetico y trifluoruro de boro: este proceso está basado en la reacción siguiente:



el equilibrio se desplaza hacia la derecha por empleo de un gran exceso de acido acetico. Después de la reacción se añade piridina para anular el efecto catalitico del F_3B , y de esta manera el metanol del reactivo no se esterifica. El agua producida se determina mediante el reactivo Karl Fischer;

2 d) acetilacion con anhídrido acetico y piridina : después de la reacción se trata la solución con una determinada cantidad de agente hidrolizante y el agua remanente se valora con el citado reactivo (59).

El metodo b) de acetilación arriba citado ha sido empleado por Meyer (53) que encuentra que el contenido de grupos acetilo varia con el tiempo de valoración (fig nº 3)

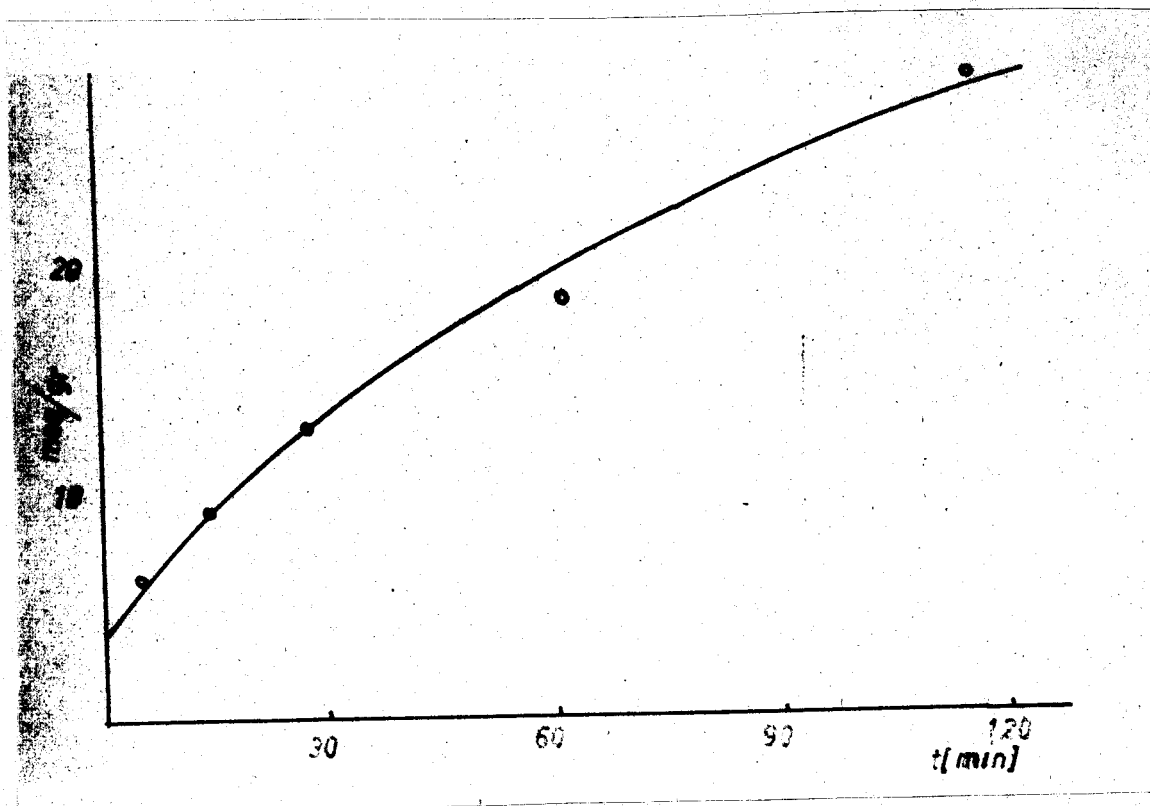


Fig. nº 3

El metodo c) antes referido no puede ser aplicado al estudio de la materia humica por las condiciones de trabajo que requiere, en especial el empleo de altas temperaturas, y por el caracter acido de aquella. El metodo d) que emplea el reactivo Karl Fischer debe rechazarse en nuestro caso ya que la materia humica consume iodo, obteniendose por lo tanto resultados falsos.

En nuestro trabajo se eligió por estas razones el metodo a) que lleva a cabo la separación del producto acetilado y la determinación de acetilo en la muestra separada. Aunque la mezcla acetilante mas común es la de piridina:anhídrido acetico, en nuestras experiencias no pudo ser empleada, ya que como producto final produciò una masa pardo oscura, que se hidroliza facilmente en el lavado con agua, obteniendose el mismo tiempo un rendimiento muy bajo.

Se extremaron las precauciones para evitar los inconvenientes señalados anteriormente para este metodo, comprobando la eliminacion total del agente acetilante, lavando con eter de petròleo con el fin de impedir la hidrolisis y realizando

numerosas determinaciones de los grupos acetilos.

En concreto el método se llevó a cabo del modo siguiente:

20 mgr. de los ácidos fúlvicos solubles en tetrahidrofurano se hicieron reaccionar durante 5 horas con 10 ml. de anhídrido acético (destilado sobre marmol) calentando en baño de aceite a 60 ° C durante 5 horas. Como comprobación de que durante ese tiempo no ocurría ninguna descarboxilación del anhídrido, se calentó éste en condiciones idénticas, pero en corriente de nitrógeno pasando luego el gas a través de un frasco que contenía una solución de hidróxido bórico con el fin de recoger el posible anhídrido carbónico producido, valorándose al cabo de las 5 horas con ácido clorhídrico 0,1 N usando fenoftaleína como indicador. Se efectuó también una prueba en blanco, comprobándose que no se producía ningún CO_2 al ser los ácidos fúlvicos acetilados en estas condiciones.

Al cabo de 5 horas, los ácidos fúlvicos estaban en solución, teniendo ésta un color pardo oscuro. Se filtró a través de un filtro G-4, lavando éste último con algunas porciones de anhídrido acético (la filtración se llevó a cabo con el fin de separar los ácidos fúlvicos que no hubieran ido en solución, lo cual no fué el caso). La solución coloreada se dejó enfriar y se añadió a una mezcla de agua y hielo, agitando a continuación con el fin de hidrolizar el exceso de anhídrido acético. Se dejó estar durante algunas horas en un refrigerador. El precipitado obtenido de color pardo claro, fué separado por filtración, y lavado varias veces con agua destilada, hasta que ésta no dió reacción ácida. La solución acuosa no presentaba ningún color, lo cual fué comprobado con un espectrofotómetro Colman, usando agua destilada como prueba en blanco, indicando que el proceso era cuantitativo. El precipitado se disolvió en una pequeña cantidad de acetona,

recogiéndose cuantitativamente. La acetona fué destilada y los ácidos fúlvicos acetilados se disolvieron de nuevo en acetona y se precipitaron con eter de petróleo. Esta última precipitación se llevó a cabo en un tubo de centrifuga. Se centrifugó y se lavó repetidas veces con eter de petróleo y por último se secó el producto durante algunas horas en un desecador al vacio de una trompa de agua.

Los ácidos fúlvicos reducidos se acetilaron de la misma manera, pero se adicionaron unas gotas de ácidos sulfúrico concentrado con el fin de catalizar la reacción, procediéndose posteriormente de la misma manera que con los ácidos fúlvicos originales.

Con las fracciones dializadas, se procedió de un modo análogo, pero se comprobó que al adicionar la solución coloreada sobre la mezcla de agua y hielo y al dejar sedimentar al cabo de unos minutos, el agua tenia un ligero color, que con el tiempo aumentaba en intensidad, lo cual indicaba una desacetilación. Por ello hasta llevar las fracciones en solución de anhídrido acético se procedió del modo indicado pero en lugar de adicionar sobre agua y hielo, se precipitó en eter seco, dejando estar algunas horas, filtrando a través de un filtro G-4 lavando con varias porciones de eter seco y procediendo a continuación como en los casos anteriores.

Los ácidos húmicos pardos se acetilaron como en el caso de la fracción soluble en tetrahidrofurano.

2.1.13. Métodos de metilación

La determinación de los grupos funcionales de la materia húmica se ha efectuado también por metilación selectiva de los diferentes grupos. Este proceso se ha llevado a cabo casi exclusivamente, sin embargo, en los comienzos de la inves-

tigación de dichos grupos.

Entre los agentes metilizantes más utilizados se encuentran los siguientes: diazometano; sulfato de metilo; metanol-cloruro de hidrógeno y ioduro de metilo.

El diazometano reacciona más o menos rápidamente con los hidróxidos fenólicos y los grupos carboxilos para dar lugar a metileter y metilester respectivamente. Puede también reaccionar con el grupo enol, formando el correspondiente eter. Para algunos autores (44) los grupos hidroxilos de carácter no ácido de la molécula de algunas fracciones de la materia húmica no se dejan metilizar por el diazometano. Sin embargo se encuentran casos en la literatura, donde los grupos hidroxilos alcohólicos pueden experimentar en ciertos casos una parcial eterificación.

El sulfato de metilo reacciona, prácticamente con todos los grupos hidroxilos (fenólicos, alcohólicos y carboxílicos) pero en medio alcalino no reacciona con los grupos ácidos.

Tanto el cloruro de metilo como el ioduro de metilo se han empleado en algunas síntesis orgánicas. Sin embargo su poder de metilación no es muy conocido. El ioduro de metilo se emplea con más profusión por su facilidad de manejo, usándose generalmente en presencia de óxido de plata que actúa como catalizador.

Como ya se ha indicado, todos estos agentes se han usado en la determinación de grupos funcionales de la materia húmica, pero según Kononowa (44) su empleo está sujeto a considerable error, ya que ninguno de ellos es específico para un grupo determinado. En nuestras experiencias se han usado indistintamente todos ellos, como comprobación de reacciones diversas aunque su empleo y seguridad está sujeto a varios factores como temperatura, tiempo de reacción, etc.

Se siguiendo principalmente dos métodos para metilar

los ácidos fúlvicos y las fracciones dializadas. Uno de los procedimientos, con diazometano, se efectuó de la siguiente manera: 200 mgr de ácidos fúlvicos solubles en tetrahidrofurano, fueron suspendidos en 10 ml de eter seco, añadiendose a continuación 20 ml de una solución de diazometano en eter, agitando y dejando estar en un refrigerador. Diariamente y durante 8 días, se adicionó nueva cantidad de diazometano y se agitó de vez en cuando. Al cabo del tiempo indicado, se destiló el eter y el diazometano en un destilador rotatorio a vacío. Los ácidos fúlvicos se disolvieron en poca cantidad de cloroformo seco y se pasaron por un filtro G-4 con el fin de eliminar el polimetileno formado.

Se concentró la solución hasta algunos c.c. y se precipitó en eter de petróleo. Se redisolvió y precipitó varias veces, la última vez en eter de petróleo en tubo de centrifuga lavando repetidamente con eter de petróleo seco y secando a vacío durante algunas horas. Se obtuvieron unos ácidos fúlvicos metilados de color amarillo claro.

Para metilar los ácidos fúlvicos con ioduro de metilo y óxido de plata, se siguió el proceso siguiente: 1 gr de ácidos fúlvicos, se disolvió en 5 ml de dimetilformamida. A esta solución se añadieron 2 ml de ioduro de metilo y 0,5 gr de óxido de plata. Se agitó esta suspensión durante 15 horas cubriendo el matraz de reacción con papel de estaño para evitar la acción de la luz. Al cabo de este tiempo se filtró la solución, se precipitó en eter de petróleo y los ácidos fúlvicos metilados se secaron a vacío.

Obtención del diazometano.- 11 gr de nitrosometiluretano se lavaron en filtro G-4 con unos 100 ml de agua helada; se secaron posteriormente y se introdujeron en un matraz de 1000 ml, adicionando por las paredes 100 ml de eter seco, para arrastrar el nitrosometiluretano que hubiera permanecido

en ellas. Después se añadieron cuidadosamente 30 ml de una solución de potasa al 40 %. Se cerró el matraz inmediatamente, destilándose el diazometano junto con el eter, al calentar el matraz en baño de agua a 50 ° C. Se recogió en un matraz erlenmeyer que contenía 50 ml de eter seco y que estaba sumergido en una mezcla de hielo carbónico y acetona. A la solución de diazometano en eter, se color amarillento, se añadieron unas cuantas lentejas de hidróxido potásico y se conservó en un refrigerador.

2.1.14. Determinación de la acidez total con hidróxido bórico.

50 mgr. de cada una de las fracciones a estudiar se pesaron en tubos de centrifuga de 250 ml provistos de tapones que ajustaban perfectamente. A continuación se añadieron 10 ml de agua destilada, agitando suavemente hasta llevar los 50 mgr a solución (con excepción de los ácidos húmicos puros que fueron suspendidos en la misma cantidad de agua). Posteriormente y en corrientes de nitrógeno se añadieron 40 ml de una solución de hidróxido bórico 0,1 N apareciendo inmediatamente un precipitado. Con gran cuidado y rapidez se dejó de pasar nitrógeno y se cerraron los tubos de centrifuga que se agitaron luego durante 18 horas. Al cabo de este tiempo se centrifugaron obteniéndose una solución débilmente coloreada en todos los casos y un precipitado (la sal bórica de las fracciones). Se pipeteó una parte alicuota, 20 ml, y se valoró con ácido clorhídrico 0,1 N usando fenolftaleina como indicador. Al mismo tiempo y en análogas condiciones se efectuó una prueba en blanco. La diferencia entre el valor obtenido en esta última y el que resultó en la valoración de las muestras de la acidez total, aplicando la fórmula siguiente:

c.c. consumidos x normalidad del clorhídrico x vol. total 1000
vol. parte alicuota x peso en mgr.

que nos da el valor en meq/gr.

2.1.15. Determinación del grupo carboxilo en acetato bórico.

50 mgr de cada una de las fracciones a estudiar se pesaron del modo indicado anteriormente y se disolvieron en 10 ml de agua destilada. En corriente de nitrógeno, se añadieron entonces 50 ml de una solución de acetato bórico 3 N. Se agitó durante 18 horas y por último se centrifugó. De la solución sobrenadante se pipeteó una parte alicuota, 20 ml, que se valoró con hidróxido sódico 0,1 N potenciométricamente. Aplicando la misma fórmula, que para la determinación de la acidez total, se obtuvieron los miliequivalentes de carboxilo por gramo de sustancia.

2.1.16. Obtención de los espectros ultravioletas (UV) é infrarrojo (IR).

Espectro ultravioleta (UV). 5 mgr de los ácidos fúlvicos originales se disolvieron en 25 ml de una solución buffer de borato, a pH 11. De aquí se pipeteó 1 ml que se llevó mediante el mismo buffer hasta 25 ml.

Del mismo modo se procedió con los ácidos fúlvicos reducidos.

La medida se efectuó desde 215 hasta 600 μ en un fotómetro espectral PMQ II, de la firma Zeiss.

Espectro infrarrojo (IR).- Los espectros de absorción en el infrarrojo fueron realizados en bromuro potásico, en un aparato Perkin Elmer nº 21, de los laboratorios de Química Orgánica del Politecnico Federal de Suiza, Zürich.

Los análisis elementales fueron efectuados en el Mikro-analytisches Laboratorium in Max-Planck-Institut für Kohleforschung, Mülheim (Ruhr), Alemania.

RESULTADOS Y DISCUSION

2.2. RESULTADOS Y DISCUSION

Como se indicó anteriormente se ha estudiado la fracción soluble en tetrahidrofurano (THF) de los ácidos fúlvicos de un Podsol, así como diversas fracciones, obtenidas por diálisis de los ácidos fúlvicos extraídos con ácido clorhídrico. Al mismo tiempo se ha estudiado la fracción de ácidos húmicos pardos.

Los análisis elementales de la fracción estudiada se encuentran en la tabla nº 3.

La valoración de los ácidos fúlvicos solubles en THF en medio acuoso con hidróxido sódico da lugar a una curva indiferenciada (fig. nº 4) en donde puede considerarse que a pH 8,5 se encuentran neutralizados tanto los grupos carboxílicos, como los hidroxilos de carácter ácido, obteniéndose un valor para el peso equivalente ácido de 155.

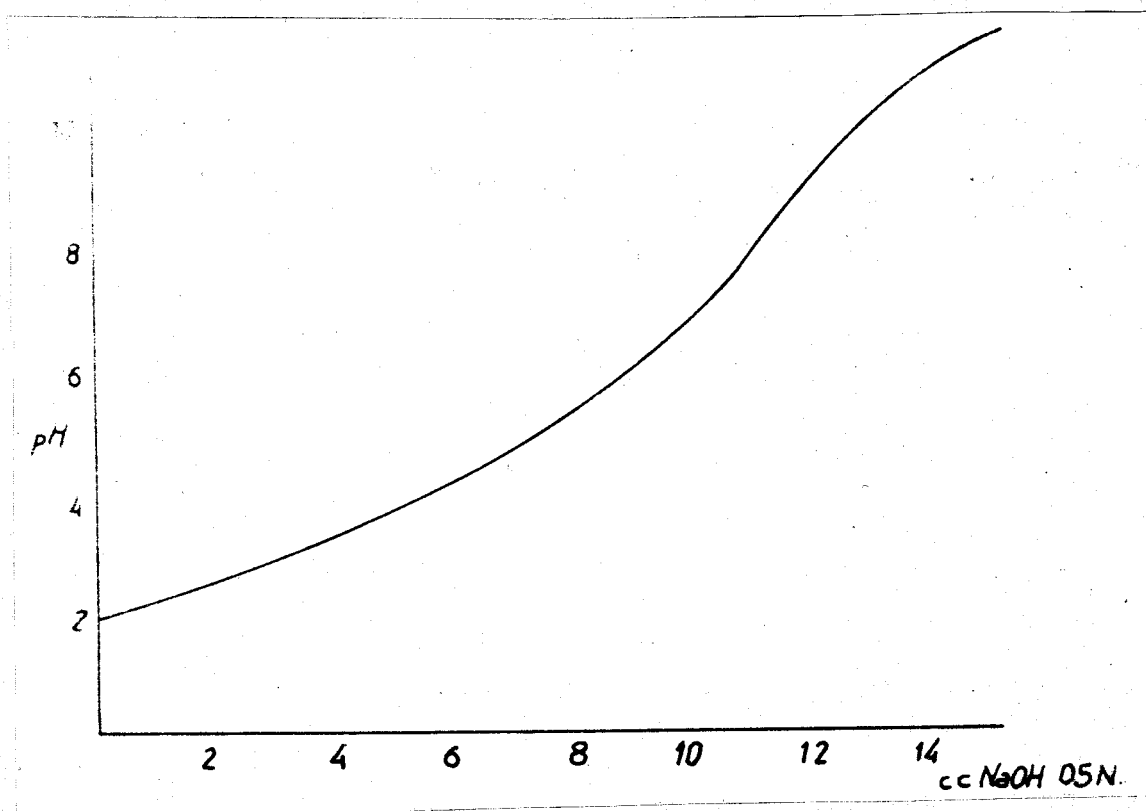


Fig. nº 4 .- Curva de valoración de ácidos fúlvicos solubles en THF, con NaOH 0,1 N.

	AF	AF-R	D ₂	D ₄	D ₇	D ₁₀	D ₁₂	D ₁₃	AHP
Cenizas	0,95		0,71	0,6	0,55	2,68	3,10	2,55	1,98
Carbono	50,86	55,60	47,63	48,48	50,03	49,06	49,50	49,35	55,99
Hidrogeno	3,6	5,53	3,06	3,06	3,52	3,22	3,28	3,86	4,30
Oxigeno	44,82	34,96	47,93	47,49	45,24	46,21	45,64	45,33	37,53
Nitrogeno	0,81	1,13	1,07	0,97	1,21	1,51	1,58	1,46	2,18
Metoxilo	1,36	0,63	0,70	--	--	--	--	--	--
Acetilo	2,33	2,16	--	--	--	--	--	--	--
Agua	8,75	6,2	7,6	8,25	7,2	7,55	7,89	7,82	6,2
Acetilos tras acetil- lación	13,35	31,03	7,79	12,70	13,20	15,87	17,78	19,57	15,63

Observación. - Todos los datos aquí expresados lo estan en %

AF= fracción acidos fulvicos solubles en tetrahidrofurano

AF-R = fracción acidos fulvicos solubles en tetrahidrofurano reducidos con diborano

D = fracciones de acidos fulvicos dializadas. Los subindices indican el orden de dialización

AHP = acidos humicos pardos

Las cantidades que se obtuvieron de las distintas fracciones por dialisis se indican en la tabla nº 4

T a b l a nº 4

Fracciones dializables de ácido fúlvico AF - ClH (20 gr).

Fracciones	Horas de Dialización	Rendimiento en gr	Densidad óptica 450 m E 1% 1 cm
D ₁	1	0,772	9,5
D ₂	16	3,709	10,0
D ₃	19	0,623	10,3
D ₄	65	5,220	11,7
D ₅	73	0,608	13,2
D ₆	88	0,800	13,8
D ₇	121	1,137	16,6
D ₈	137	0,761	18,3
D ₉	184	0,637	18,4
D ₁₀	328	1,009	19,9
D ₁₁	383	0,924	23,0
D ₁₂	472	0,556	25,4
D ₁₃	resto	2,202	28,5
AF	-	-	20,0
AHP	-	-	64,0

En todas las fracciones se determinó el peso molecular, por empleo de una columna de Sephadex (51). Las curvas encontradas se muestran en la figura nº .

En abcisas se representan los mililitros eluidos de la columna y en ordenadas la densidad óptica medida a 465 . Se observa que a medida que el máximo se desplaza hacia la izquierda, es decir, que el máximo de absorción aparece antes en el eluato, aumenta el peso molecular de la sustancia. El Sephadex consta de pequeños granulos de caracter hidrofílico, formados por el polisacarido Dextran. Este consiste en una red

tridimensional formada por cadenas de polisacaridos. Si el Sephadex se encuentra disperso en una solución salina, la sustancia a investigar puede moverse libremente a través de la red estructural en los granos del gel. Para sustancias

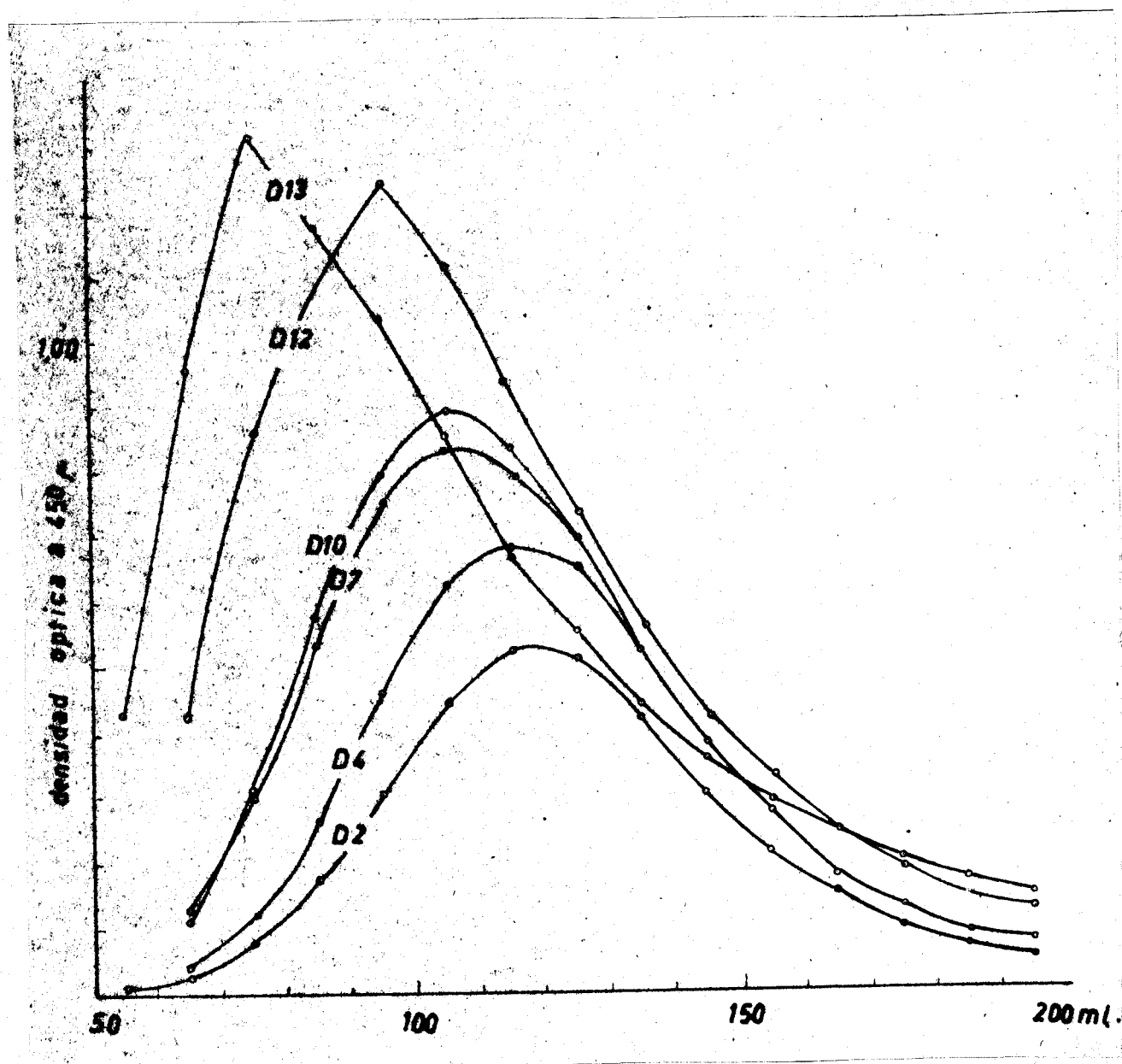


Fig. nº 5 .- Curvas de determinacion de los pesos moleculares de las fracciones dializadas, por medio del Sephadex.

con gran dimensión molecular, la difusión a través de los granos se ve restringida según la porosidad de la red de tal manera que las grandes moléculas no pueden penetrar en el interior y son por tanto más pronto eluidas, en tanto que las de menor dimensión molecular penetran por difusión y son posteriormente eluidas.

Todos nuestros experimentos han sido previamente comparados con sustancias modelo, antes de ser efectuados en el material bajo estudio. Estas sustancias modelo no han sido elegidas al azar, sino a la vista de los resultados obtenidos por diversos autores (42, 11, 78) al degradar diversas fracciones de materia húmica con ácidos y álcalis, obteniéndose una variedad de polifenoles y ácidos benzolcarbónicos.

Al mismo tiempo se han estudiado diversas sustancias que han sido empleadas como elementos de partida para la formación de ácidos húmicos sintéticos.

Para la determinación del hidrógeno activo se han empleado las sustancias modelo que se incluyen en la tabla nº 5.

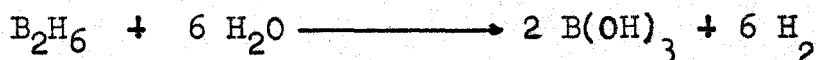
Tabla nº 5

Sustancias modelo utilizadas para la determinación de hidrógeno activo con diborano

Sustancias	Disolvente	Peso en mg	Tipo de reacción	H ₂ desahollado	H ₂ activo Práctico	H ₂ activo Teórico
Pirocatequina	THF-5 ml	110	Homogenea	46 ml	41,8	40,9
	THF-5 ml	102	"	41 ml	40,1	40,8
	THF-5 ml	74	"	30 ml	40,5	40,8
Resorci-na	THF-5 ml	110	Homogenea	44 ml	40,0	40,9
	THF-5 ml	80	"	33 ml	41,2	40,9
Hidroqui-nona	THF-5 ml	125	Homogenea	51 ml	40,8	40,9
	THF-5 ml	94	"	38 ml	40,4	40,8
Florogu-cina	THF-5 ml	124	Homogenea	66 ml	53,2	53,3
	THF-5 ml	70	"	37 ml	52,8	53,3
Ac. 3,4-di-hidroxi-benz	THF-5 ml	130	Homogenea	57 ml	43,8	43,6
	THF-5 ml	105	"	46 ml	43,8	43,6
Ac. 2,4-di-hidroxi-benz	THF-5 ml	120	Homogenea	52 ml	43,3	43,6
Ac. 3,5-di-hidroxi-benz	THF-5 ml	145	Homogenea	63 ml	43,4	43,6
	THF-5 ml	80	"	35 ml	43,7	43,6
Ac. vanilli-co	THF-5 ml	150	Homogenea	40 ml	26,6	26,6
	THF-5 ml	92	"	24 ml	26,0	26,6
Ac. p-cuma-rico	THF-5 ml	102	Homogenea	28 ml	27,4	27,2
	THF-5 ml	130	"	35 ml	26,9	27,2
Ac. o-cuma-rico	THF-5 ml	142	Homogenea	39 ml	27,4	27,2
	THF-5 ml	83	"	23 ml	27,7	27,2
Quinona	THF-5 ml	93	Homogenea	0 ml	0,0	0,0
Ac. benzoi-co	THF-5 ml	112	Homogenea	20 ml	17,8	18,1
	THF-5 ml	71	"	13 ml	18,4	18,1
2,5-dihi-droxiqui-nona	THF-5 ml	120	Homogenea	39 ml	32,5	32
	THF-5 ml	75	"	25 ml	32	32
Ac. muco-nico	THF-5 ml	130	Heterog.	41 ml	31,5	31,5
	THF-5 ml	85	"	27 ml	31,7	31,5
Ac. isofta-lico	THF-5 ml	140	Heterog.	38 ml	27,1	27
	THF-5 ml	118	"	32 ml	27,1	27
Ac. cafei-co	THF-5 ml	164	Heterog.	35 ml	27,8	27,7
	THF-5 ml	101	"	28 ml	27,6	27,7

Todas estas sustancias fueron previamente secadas a 40 ° C y alto vacio, con pentóxido de fósforo. Como se observa en la tabla el desarrollo de hidrógeno concuerda exactamente con el valor esperado.

La eliminación de agua en las muestras es muy importante ya que el diborano reacciona con el agua para dar lugar a un desprendimiento de hidrógeno segun la ecuación siguiente:



pero inmediatamente ocurre una reacción entre el ácido bórico y el exceso de diborano dando lugar a la formación de un mol de hidrógeno por cada grupo OH del ácido bórico.

En la serie de sustancias modelo investigadas, el desarrollo de hidrógeno ocurrió de una manera rápida y cuantitativa, y la reacción se terminaba al cabo de unos 5 minutos. Observamos sin embargo que la reacción transcurría mejor cuando el agua absorbida de la muestra no era eliminada, teniendo-se por consiguiente que hacer una corrección final correspondiente al hidrógeno desarrollado por este agua, que era determinada por pérdida de peso.

En todos los casos es necesario efectuar una prueba en blanco, puesto que el tetrahidrofurano (a pesar de ser redestilado varias veces) contiene siempre una cantidad de agua, que se incrementa con el tiempo, y el matraz de reacción contiene siempre algo de humedad .

Como se observa en la tabla precedente, la reacción transcurre homogénea y heterogéneamente, es decir, cuando la sustancia se encuentra en solución y cuando se encuentra solo suspendida en algun disolvente. En toda la serie de sustancias probadas no se observó al final la presencia de ningun precipitado; y solo al cabo de mucho tiempo, se observaba una pequeña opalescencia.

Al mismo tiempo de estar nosotros efectuando estas experiencias un trabajo (50) confirmaba nuestros resultados. El método descrito es exactamente análogo al empleado por nosotros, solo que la determinación de hidrógeno se efectúa manométricamente, necesitando para ello un previo calibrado del aparato. La precisión de este método es del mismo orden que la del empleado por nosotros.

Al efectuar los primeros ensayos con la fracción de ácidos fúlvicos, se observó la formación de un precipitado tan pronto como comenzaba la reacción con diborano.

En un principio se pensó que esto era debido a la formación de un organoborano, por reacción con los dobles enlaces que pudieran estar presentes en los ácidos fúlvicos. Sin embargo al realizar la experiencia con la fracción de ácidos fúlvicos acetilados o metilados, se observó que no ocurría al comienzo la formación de ningún precipitado y que éste solo aparecía al cabo de algún tiempo, variable según el grado de metilación o acetilación de la muestra. Por ello se llegó a la conclusión que el precipitado era debido a la formación de un producto de unión del diborano con grupos OH (tanto hidroxilos como carboxilos) de las moléculas de ácidos fúlvicos no apareciendo con las fracciones metiladas o acetiladas porque en ellas estos grupos se encuentran protegidos en su mayor parte. Una vez que el diborano reacciona con los grupos esterés o éteres, aparece el precipitado.

Una vez realizada la adición de diborano a la solución de ácidos fúlvicos en THF se comprobó que el precipitado pardo que se formaba inmediatamente absorbía una gran cantidad de reactivo. Esta circunstancia se demostró por el hecho de que si al cabo de una media hora se tomaba una porción de las soluciones claras sobrenadantes y se trataba con agua, ocurría solo un pequeño desprendimiento de hidrógeno. Por el contrario

el precipitado producía una gran cantidad de este gas por adición de agua, indicando que una gran parte del exceso de diborano permanecía absorbido sobre el producto sólido.

Como al mismo tiempo se efectuaba una prueba en blanco con el fin de descontar el hidrógeno producido por la humedad del THF y del matraz de reacción, y como en esta prueba no existía precipitado alguno que absorbiera diborano, éste último reaccionaba con mayor rapidez con las trazas de humedad del disolvente y del matraz. Como al entrar el hidrógeno producido en esta reacción del desarrollado por la muestra problema, podría introducir algún error, sobre todo si el tiempo de reacción de esta última no era suficientemente largo, se decidió suprimir la prueba en blanco, realizando las determinaciones con tres pesos diferentes de ácidos fúlvicos, disueltos siempre en la misma cantidad de THF y añadiendo en todos los casos la misma proporción de reactivo en exceso (1 ml de la solución de diborano). Los valores obtenidos se encuentran en la tabla nº 6.

Tabla nº 6

Hidrógeno desarrollado en la reacción de ácidos fúlvicos secos al aire con diborano

peso en mgr	ml de THF	ml de BH_3	tiempo	Hidrógeno desarrollado ml
10	5	1	5 min.	25,85
20	5	1	5 min.	31,00
30	5	1	5 min.	36,2

Si estos valores se llevan a una gráfica se obtiene la línea recta que aparece en la figura nº 6.

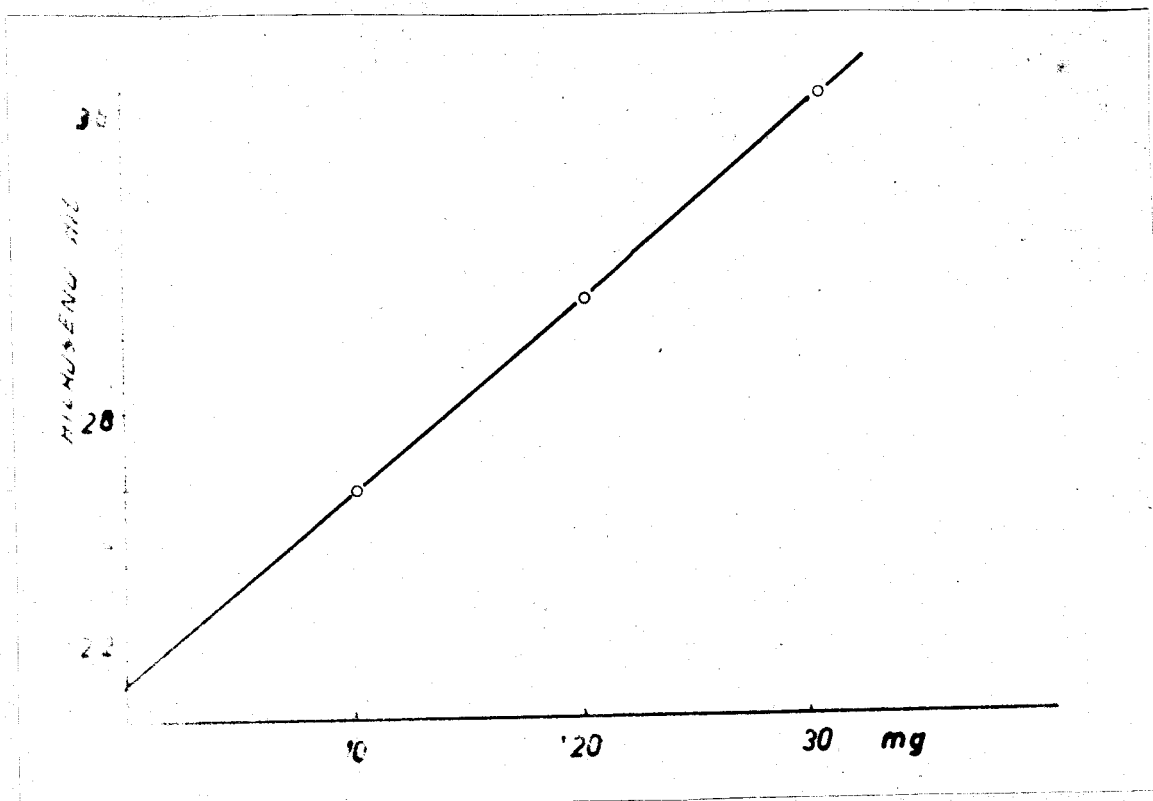


Fig. nº 6 Hidrogeno desarrollado en la reacción de ácidos fulvicos secos al aire con diborano

Como puede observarse los tres valores obtenidos coinciden perfectamente en una línea recta, lo que permite conocer el hidrógeno desarrollado por la muestra a partir de la diferencia entre cualquier pareja de los que figuran en la gráfica.

Como el agua produce hidrógeno al reaccionar con el diborano y como la experiencia anterior se realizó con la muestra secada al aire, hay que sustraer del resultado obtenido la cantidad de hidrógeno correspondiente al contenido en agua del material. En ensayos realizados por otros autores (93) con diversas fracciones de la materia húmica, el agua fué eliminada por calentamiento a 105° C. Sin embargo nosotros hemos comprobado que a esa temperatura tiene lugar una lenta decarboxilación de los ácidos fúlvicos, por lo que la determinación de agua se efectuó a 40 ° C y alto vacío, con pentóxido de fósforo (anteriormente se comprobó que en estas condiciones ni se

descarboxilan los ácidos fúlvicos ni cambian las propiedades físicas de su molécula (51).

Con los ácidos fúlvicos así secados se determinó el hidrógeno activo, con el fin de comprobar si la diferencia en la cantidad de hidrógeno producido respecto a la del material seco al aire estaba de acuerdo con el contenido de humedad de éste último. Los valores obtenidos se encuentran en la tabla nº 7 y se representan en la figura nº 7 .

Tabla nº 7

Hidrógeno desarrollado en la reacción de ácidos fúlvicos desecados con diborano

peso en mgr.	THF en ml	BH ₃ en ml	tiempo	Hidrógeno desarrollado ml
10	5	1	5 min.	23,4
20	5	1	5 min.	26
30	5	1	5 min.	29

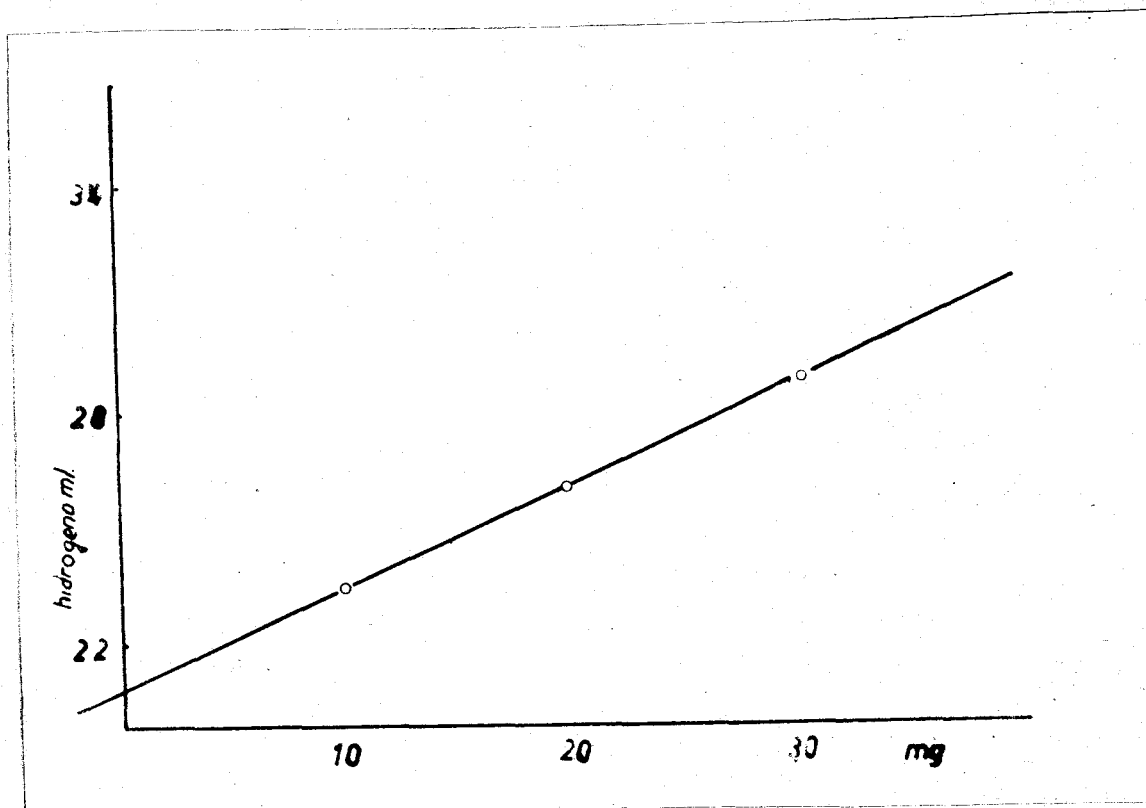


Fig. nº 7 .- hidrogeno desarrollado en la reaccion de acidos fulvicos desecados, con diborano

A partir de esta gráfica puede conocerse como en el caso anterior, la cantidad de hidrógeno desarrollado por un peso conocido de sustancia.

A partir de estos datos pudo comprobarse que la cantidad de hidrógeno producido en la reacción del material desecado, coincidió exactamente con el desarrollado por el peso correspondiente de sustancia seca al aire, una vez descontado el que se debe a la reacción con el agua contenido en la muestra en estas últimas condiciones (contenido de agua = 8,75 %).

La tabla nº 8 contiene los datos de hidrógeno producido por fracciones de ácidos fúlvicos (obtenidas por diálisis) secadas al aire, al reaccionar con diborano.

Tabla nº 8

Hidrógeno desarrollado por diversas fracciones de ácidos fúlvicos en reacción con diborano

Fracción	peso en mgr	THF en ml	BH ₃ en ml	tiempo	Hidrógeno desarrollado ml
D ₂	20	5	1	5 min.	31
D ₂	35	5	1	5 min.	38,75
D ₂	50	5	1	5 min.	46,5
D ₄	20	5	1	5 min.	31
D ₄	35	5	1	5 min.	38,75
D ₄	50	5	1	5 min.	46,5
D ₇	20	5	1	5 min.	29,75
D ₇	35	5	1	5 min.	36,5
D ₇	50	5	1	5 min.	43,25

Las rectas obtenidas se encuentran en las fig. nº 8 y 10 respectivamente.

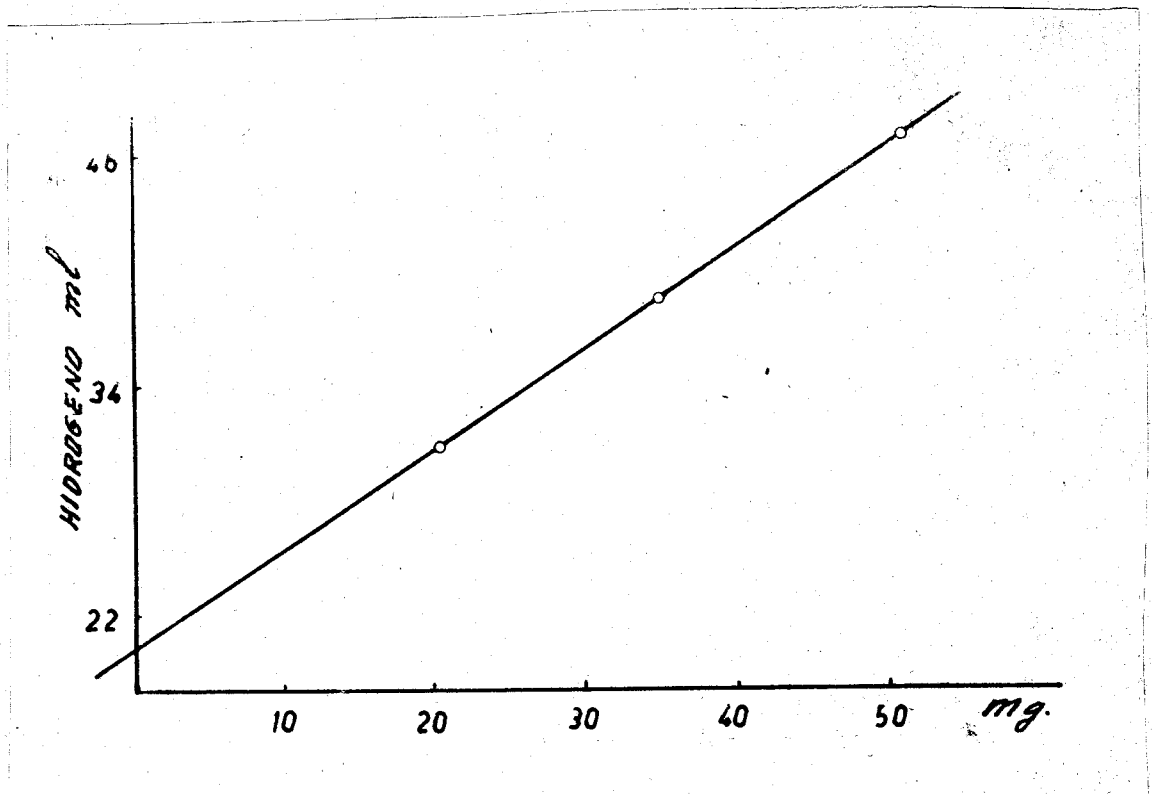


Fig. nº 8 .- Hidrogeno desarrollado por la fracción D₂ con diborano

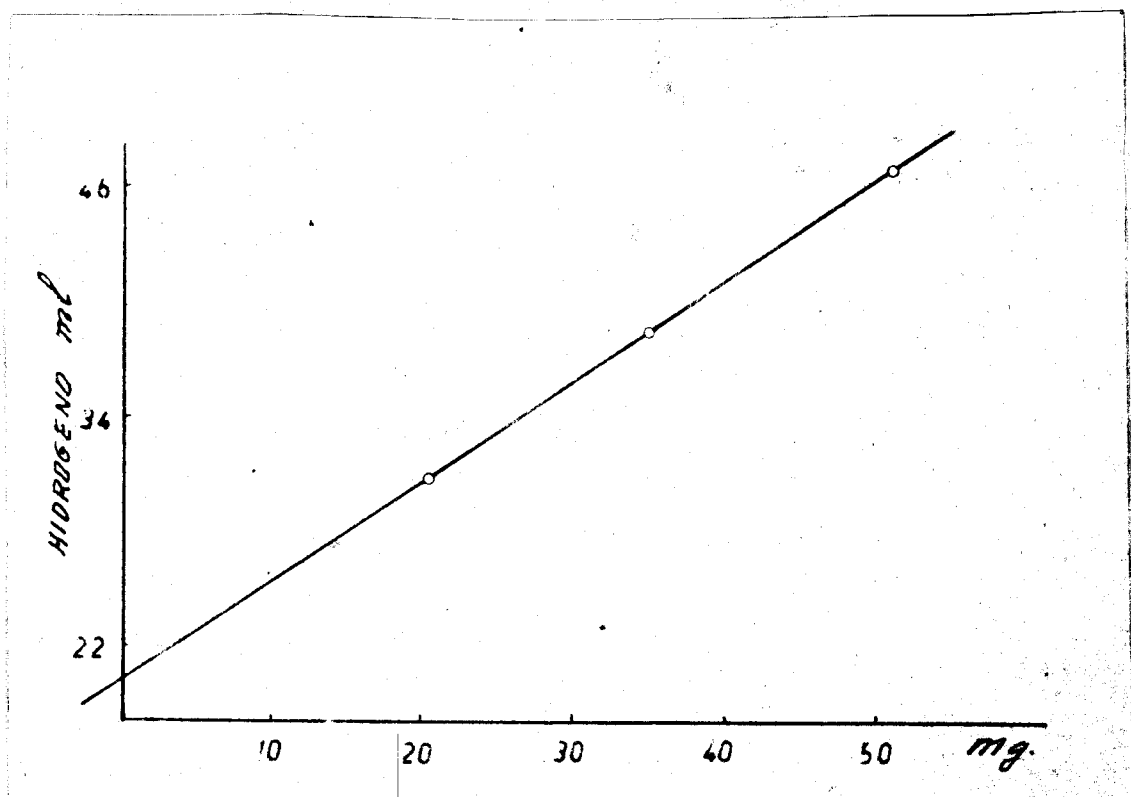


Fig. nº 9 .- Hidrogeno desarrollado por la fracción D₄ con diborano

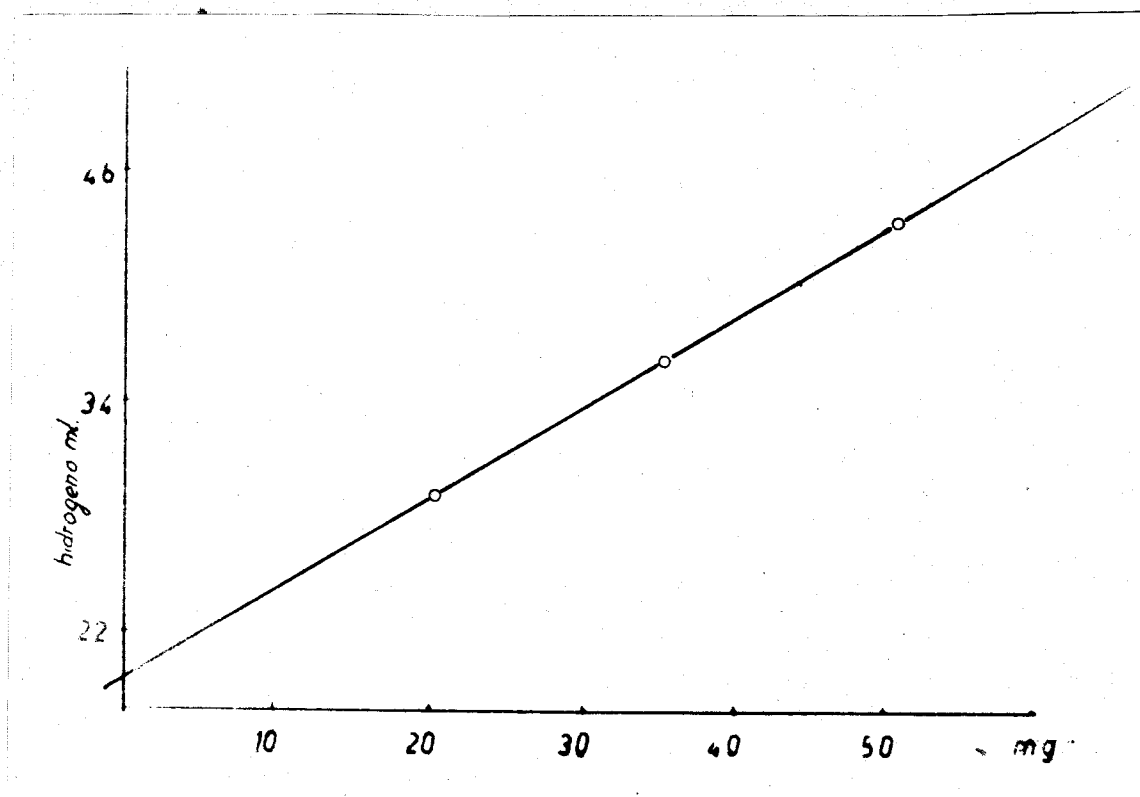


Fig. nº 10 .- Hidrogeno desarrollado por la fracción D₇ con diborano

Como las fracciones D₁₀ , D₁₂ y D₁₃ (las fracciones intermedias no se estudiaron por la pequeña cantidad de que se disponia) no eran solubles en THF, el estudio hubo de realizarse en otro disolvente, habiendose elegido a este fin la dimetilformamida (DMF) despues de numerosos ensayos. Aunque este disolvente no es inerte al diborano ya que tiene un grupo carbonilo susceptible de ser reducido, la velocidad de desarrollo de hidrógeno es mayor que la de reducción, por lo que con una adición mayor de diborano pudo ser utilizado. Tambien se determinó el desarrollo de hidrógeno en estas fracciones, suspendiendolas en THF, y aunque ~~sea~~ necesario un periodo mayor de reacción los resultados obtenidos concordaron perfectamente con los que se obtenian en dimetilformamida. Estos últimos se resumen en la tabla nº 9.

Tabla nº 9

Hidrógeno desarrollado en la reacción con diborano de diversas fracciones de ácidos fúlvicos

Fracción	Peso mgr	ml DMF	ml BH ₃	tiempo	hidrógeno desarrollado ml
D ₁₀	15	6	2	5 min.	21
D ₁₀	30	6	2	5 min.	27,5
D ₁₀	45	6	2	5 min.	34
D ₁₂	15	6	2	5 min.	30,2
D ₁₂	30	6	2	5 min.	37,4
D ₁₂	45	6	2	5 min.	44,6
D ₁₃	10	6	2	5 min.	27,5
D ₁₃	20	6	2	5 min.	32
D ₁₃	30	6	2	5 min.	36,25

La representación gráfica correspondiente, que se omite por razón de brevedad, da asimismo líneas rectas.

Idéntico ensayo se efectuó con la fracción de ácidos húmicos pardos. Al igual que las fracciones D₁₀ - D₁₃ los ácidos fúlvicos los ácidos húmicos solo pudieron solubilizarse en DMF. La reacción se llevó a cabo también en este disolvente y sobre la suspensión de la sustancia en THF obteniéndose resultados perfectamente concordantes en ambos casos. Los valores obtenidos en DMF se resumen en la tabla nº 10.

Tabla nº 10

Hidrógeno desarrollado en la reacción de ácidos húmicos pardos con diborano

Fracción	peso mgr.	ml DMF	ml BH ₃	tiempo	hidrógeno desarrollado ml
ac. húm. par.	15	6	2	5 min.	28
id	30	6	2	5 min	33,25
id	45	6	2	5 min.	38,5

Todos los ensayos referidos se realizaron sobre muestras desecadas sobre P_2O_5 en las condiciones antes referidas y sobre material seco al aire, obteniéndose resultados concordantes una vez tenido en cuenta el hidrógeno producido por reacción del diborano con el agua contenida en el material en estas últimas circunstancias.

En todas las fracciones aquí señaladas, se determinó la acidez total por medio de la reacción con hidróxido bórico. Para ello se agitaron las muestras con una solución de hidróxido bórico durante algunas horas (según se indicó en el lugar correspondiente) valorando luego con ácido el exceso de hidróxido que no fué neutralizado por el material y calculando con auxilio de una prueba en blanco el número de meq/gr consumidos. Los valores obtenidos junto con los datos de hidrógeno desarrollado se muestran en la tabla nº **11**.

Tabla nº 11

Fracción	% de H ₂ O en mgr	H ₂ desarrollado en ml por 100 mgr de sustancia se- cada al aire	Corrección a C.N. en ml. de sustan- cia secada al aire	Desarrollo en ml por 100 mgr de sustancia secada a 40° C sobre P ₂ O ₅ en vacío	OH en meq/gr calculados a partir del H ₂ desarrollado	Acidez total determinada con Ba(OH) ₂
AF	8,7	51,6	45,46	26	11,6	11,2
D ₂	7,6	51,6	46	29,25	13	12
D ₄	8,25	51,6	46	27,6	12,4	11,6
D ₇	7,2	43,2	40	23,7	10,6	10,2
D ₁₀	7,55	43,4	38,6	21,4	9,6	9,9
D ₁₂	7,89	48	42,2	20,8	9,3	9,6
D ₁₃	7,82	43,7	38,05	20,6	9	8,8
AHP	6,2	34,2	30,5	17,05	7,15	8,6

OBSERVACION:

1 % de agua contenida en el material corresponde a 2,48 ml de hidrógeno (C.N.) producido por reacción agua - diborano.

Como en el caso del desarrollo de hidrógeno, las sustancias modelos utilizadas para la reducción fueron elegidas tomando como base la naturaleza de los productos obtenidos en la degradación de sustancias humicas, o la de aquellas utilizadas con más frecuencia para la formación de ácidos húmicos sintéticos.

Aunque existen algunos datos en la literatura (8) acerca de la reducción de diferentes sustancias orgánicas por diborano, se han repetido algunos de estos ensayos con el fin de comprobar y poner a punto el método a emplear en nuestro trabajo. A este respecto pudo observarse que la velocidad con que ocurren estas reducciones no corresponde exactamente con los datos publicados. Algunas sustancias, como el ácido benzoico, necesitaron un período de varias horas para la reducción completa. A medidas que aumentaron los sustituyentes en el núcleo, la reducción transcurría de un modo más lento; así el ácido salicílico necesitó un gran exceso de diborano y un período de algunas horas aunque ni siquiera en estas condiciones fuera completa la reducción, como se comprobó por el estudio cromatográfico de los productos resultantes.

La serie de ácidos dihidroxibenzoicos, necesitaron de 20 a 24 horas para ser reducidos completamente.

A causa de estos largos periodos de reducción, no fue posible determinar la cantidad de hidrógeno adsorbido por la molécula (quedaría una idea de los grupos carbonilos reducibles) dato que se estimaba de gran interés ya que en primera aproximación y junto con los valores de desarrollo de hidrógeno

Tabla nº 12

Reducción de sustancias modelo con diborano

Sustancia	tiempo de reacción	rendimiento
Acido benzoico	2 horas	30%
	8 "	95%
Acido salicilico	2 horas	50%
	8 "	70%
	16 "	95%
Acido p-cumarico	2 horas	30%
	8 "	60%
	16 "	95%
Acido cafeico	2 horas	30%
	8 "	70%
	16 "	95%
Ac. 3,5-dihidroxi- benzoico	2 horas	20%
	8 "	50%
	24 "	95%
Ac. 3,4-dihidroxi- benzoico	2 horas	30%
	8 "	60%
	24 "	95%
Ac. purpurogalico	1 hora	?
Quinona	0.5 hora	100%
Timoquinona	0.5 hora	100%
2,5-dihidroxi- quinona	0.5 hora	?

permitiría diferenciar entre los grupos carbonilos en carboxi-
lo y grupos carbonilo en cetonas, aldehidos y quinonas.

Las sustancias modelo reducidas se indican en la
tabla nº 11 .

Los ácidos, a excepción del ácido purpurogálico, no
presentan cambios de color al ser reducidos, pero las quinonas,
se decoloran inmediatamente al reaccionar con diborano. Esta
decoloración dura un período de tiempo variable: la benzoquino-
na tan pronto como se adiciona agua para eliminar el exceso de
diborano comienza a colorearse nuevamente de amarillo; la timo-
quinona reducida permanece incolora algunos días incluso en con-
tacto con el aire y la diduroquinona no experimenta cambio de
color en la reducción.

Un caso interesante es el de la 2,5-dihidroxiquinona
que al reaccionar con el diborano dió lugar a toda una serie
de colores análogos a los observados por Zetsche y Reinhardt
(95) en la reducción de los ácidos húmicos con amalgama de so-
dio: la sustancia, que presenta un color pardo oscuro en solu-
ción, pasa a un azul intenso tan pronto se pone en contacto
con diborano, para tomar luego un color verde oscuro al ser agi-
tada en el aire, pasando finalmente a verde claro, amarillo y
por último al color original.

Se cromatografiaron el producto azul y el producto
final. El primero al ponerse en contacto con el disolvente de
cromatografía, se hidrolizó, dando lugar a las mismas sustancias
que el producto final. En el revelado del cromatograma se obtu-
vieron dos manchas que no pudieron identificarse por carecer
de sustancias modelo, tratandose probablemente de producto de
polimerización o de los tetraoxigenoles.

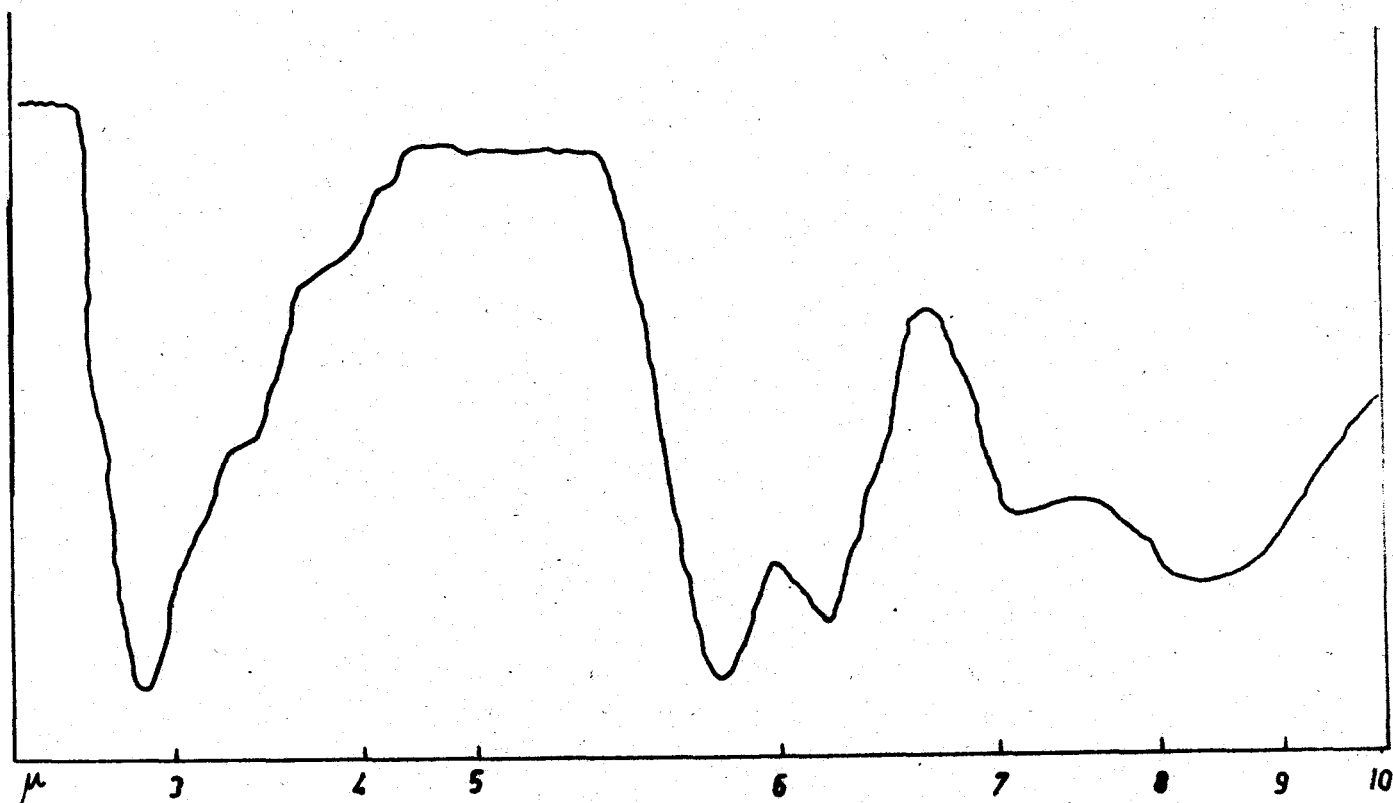


Fig. nº 13. espectro de adsorción en el infrarrojo de la muestra original: ácidos fulvicos solubles en THF.

La fig. nº 13 representa al espectro de adsorción en el infrarrojo de los ácidos fulvicos solubles en THF.

Teniendo en cuenta los estudios efectuados en la química del carbón y de la lignina, las bandas que aparecen pueden ser atribuidas con bastante probabilidad a los grupos que se mencionan a continuación.

Banda de absorción μ	Interpretación
3.0	OH asociados
3.3	Grupos CH aromáticos
3.4	Grupos CH alifáticos
5.8	Grupo C=O
5.9	Grupo C=O
6.0	Enlace C=C
6.25	Anillo aromático
6.35	Anillos aromáticos condensados.
6.85	CH ₂ alifáticos y grupos CH ₃
7.3	Grupo CH ₃
8.0	
8.5	Posiblemente -C-O y/o
9.7	C-O-C
11.75	
12.3	Esqueleto policíclico
13.3	aromático

Sin embargo como indicamos anteriormente (pág. 21) sólo el grupo carboxílico ha sido claramente puesto de manifiesto en la banda que se presenta a 5.85 μ .

A la vista de los resultados obtenidos con las sustancias modelo, se realizó la reducción de la fracción de ácidos fúlvicos solubles en THF, dejándolos estar durante dos días en contacto con diborano, eliminando este al fin del período de reacción por hidrólisis y realizando sucesivas adiciones de alcohol metílico para eliminar el ácido bórico como éter metílico.

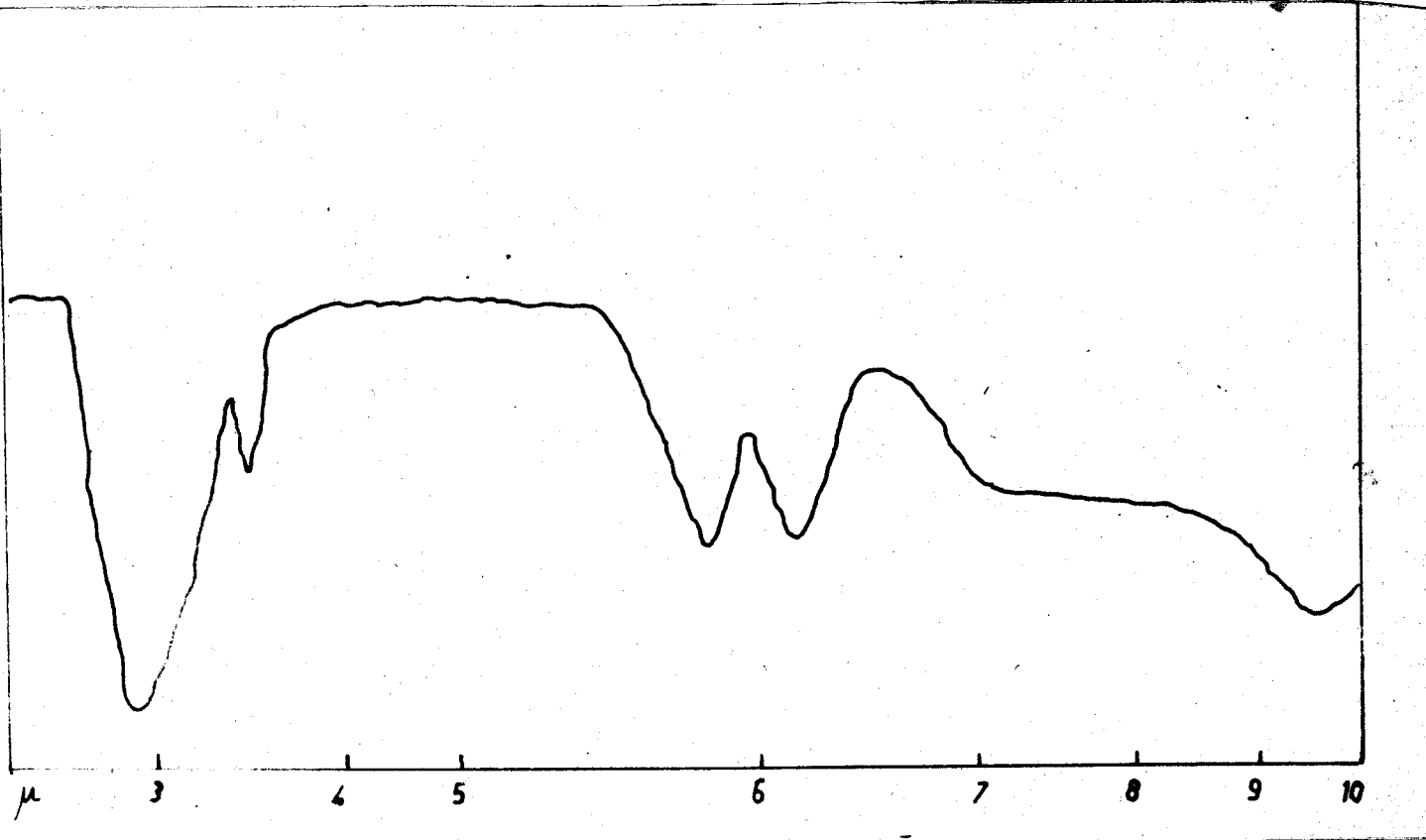


Fig. 14 Espectro de absorción en el infrarrojo de la fracción de ácidos fúlvicos solubles en THF, reducidos a H_2H_6 durante 48 horas.

Se observa una disminución de la banda de absorción a $5,85 \mu$ así como la aparición de otra banda a 3.5μ , esta última puede atribuirse a OH, asociados, aunque esta hipótesis no está demostrada.

Como la banda más interesante de estudiar y observar es la de 5.85μ , es decir, la que corresponde a la presencia de grupos carboxilo, se efectuó una nueva reducción aumentando el período de reacción a una semana, efectuando a continuación las mismas operaciones ya indicadas con el fin de eliminar el ácido bórico que podría interferir en la obtención del espectro

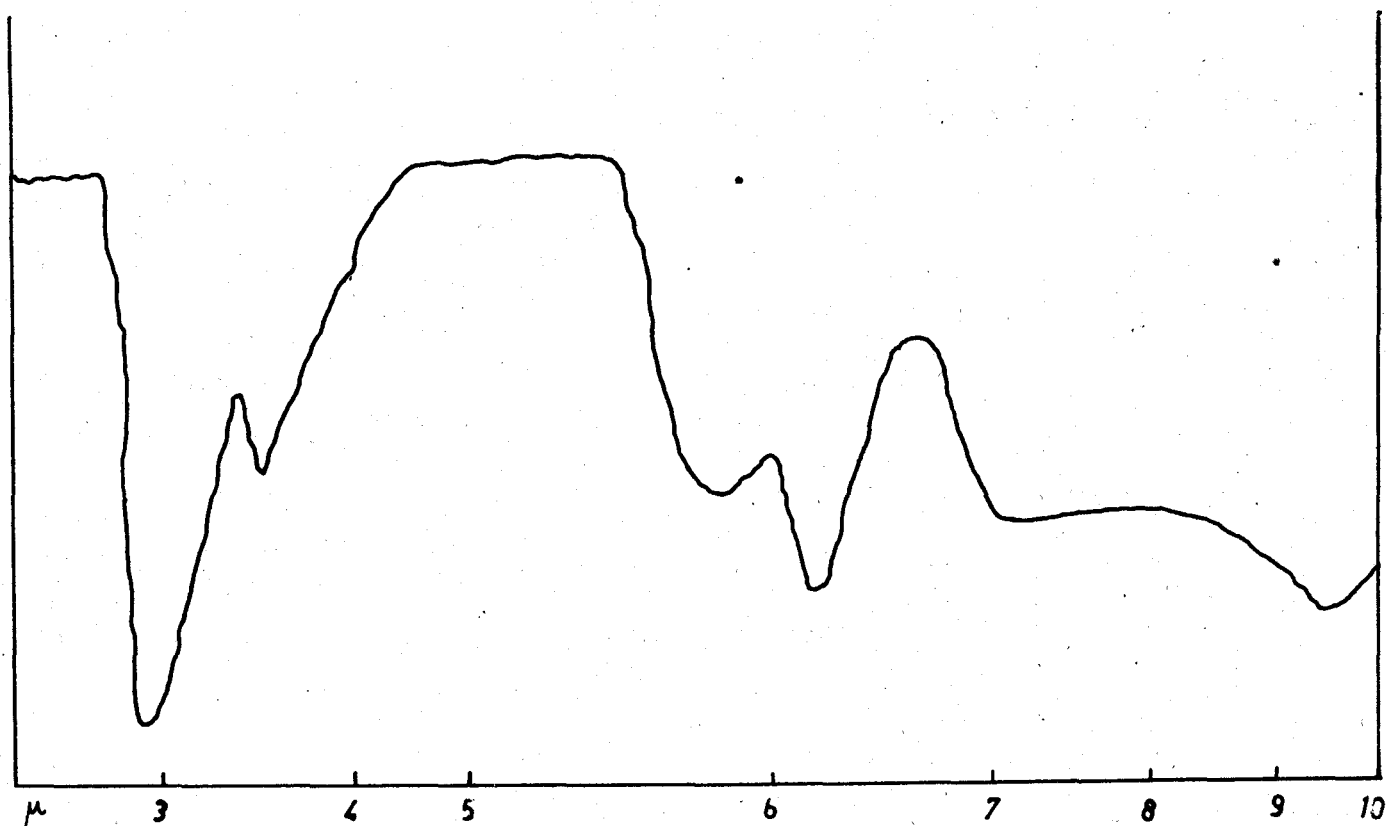


Fig. 15 Espectro de absorción en el infrarrojo de la fracción de ácidos fúlvicos solubles en THF, reducidos con BH_3 durante una semana.

IR. El espectrograma correspondiente del producto obtenido se muestra en la fig. 15.

Si se exceptúa el hecho de que la banda de 5.85μ ha disminuido un poco más que en el caso anterior, no se observa ningún otro cambio notable en este espectro.

Para comprobar por otro lado el efecto de la reducción, una parte de la sustancia tratada con B_2H_6 durante una semana se acetilo con anhídrido acético, determinándose posteriormente el contenido en acétilo. Se encontró que éste era del orden de 22.42 % en tanto que en el material original acetilado en las mismas condiciones es de 13,35 %. La diferencia

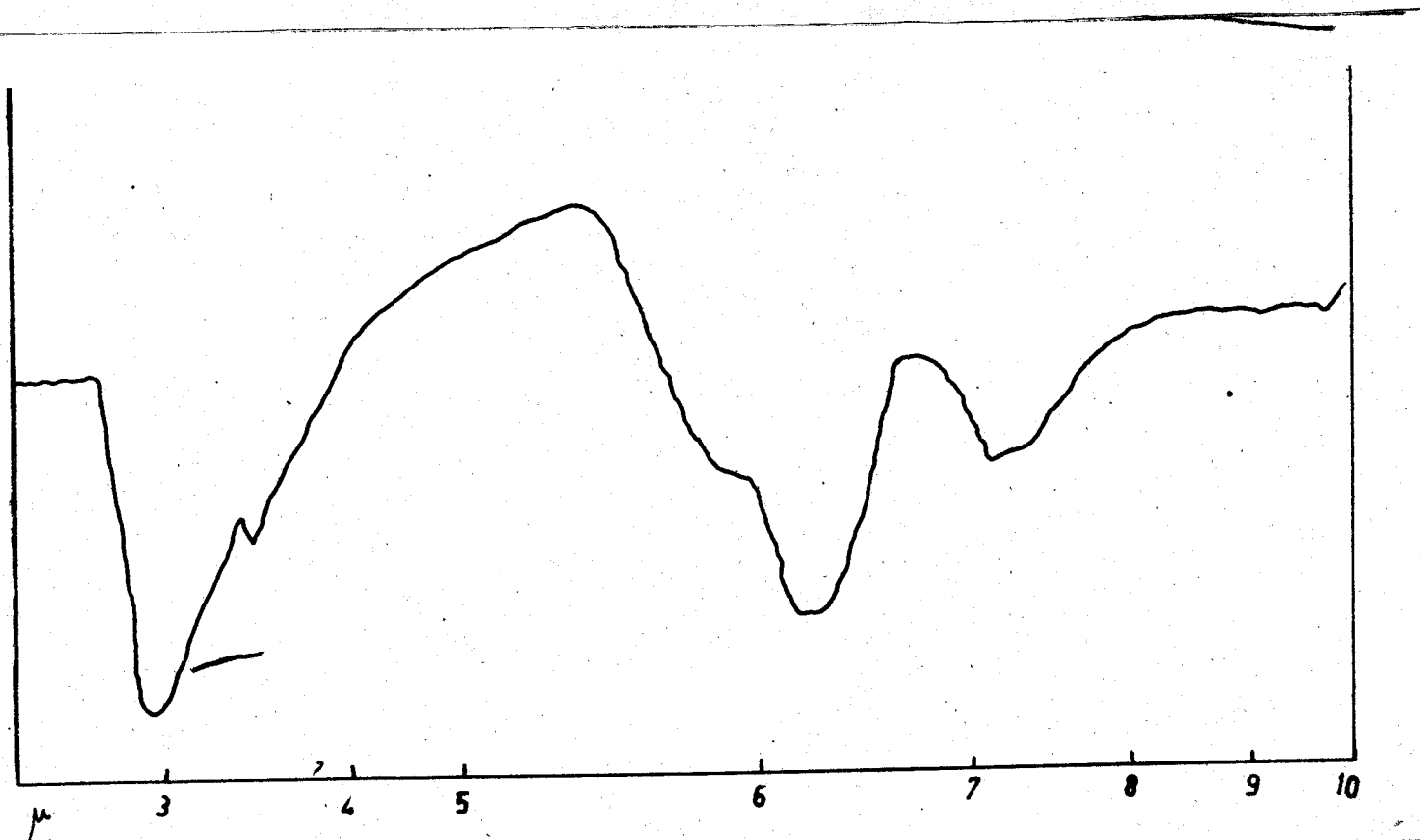


Fig. 16 Espectro de absorción en el infrarrojo de la fracción de ácidos fúlvicos solubles en THF, reducidos con AlLiH_4 .

representa un contenido adicional de 2,4 meq/gr. de grupos acetilables en los ácidos fúlvicos que fueron reducidos durante una semana. Este hecho representa una comprobación lograda por un medio diferente al hasta ahora utilizado (95), de que al menos parte de la banda a $5,85 \mu$ se debe a la presencia de grupos carbonilo en la molécula de los ácidos fúlvicos. Estos grupos carbonilos son reducidos a alcohol por el diborano con lo que pueden ser luego acetilados.

El resto de la absorción a $5,85\mu$ que todavía permanece en el espectro que se muestra en la fig 15, puede atribuirse a quinonas que aunque serían reducidas por el diborano volverían a oxidarse nuevamente, como ocurrió en el caso de las quinonas modelo antes referido.

En vista de que al cabo de una semana de reducción de los ácidos fulvicos, no era completa (a pesar de que en la bibliografía existente al respecto se indica que la velocidad de esta reacción de reducción del grupo carboxilo es muy grande), se ensayó la reducción con hidruro de aluminio y litio que había sido ya utilizado (53) al parecer con éxito en la reducción de ácidos húmicos.

El espectro correspondiente que se muestra en la fig 16 , indica que ^{con} el tratamiento con hidruro de aluminio y litio desaparece casi por completo la banda de $5,85\mu$. Sin embargo pudo observarse que el contenido en cenizas del material resultante era muy superior al del material original y al del producto de la reducción con diborano. Para aclarar esta cuestión que atribuíamos a la presencia de aluminio y litio en la sustancia obtenida, se efectuó la reducción en las mismas condiciones pero el exceso de $AlLiH_4$, se eliminó por adición cuidadosa de ácido clorhídrico y lavados posteriores del producto reducido con este mismo ácido. El contenido en cenizas quedó reducido al 2%. Un nuevo espectro de infrarrojo del material resultante después de los lavados, que se muestra en la fig 17, indica claramente que no ha tenido lugar ninguna reducción.

Al reducir pues con $AlLiH_4$, lo que se había conseguido era la sal de aluminio de los ácidos fulvicos.

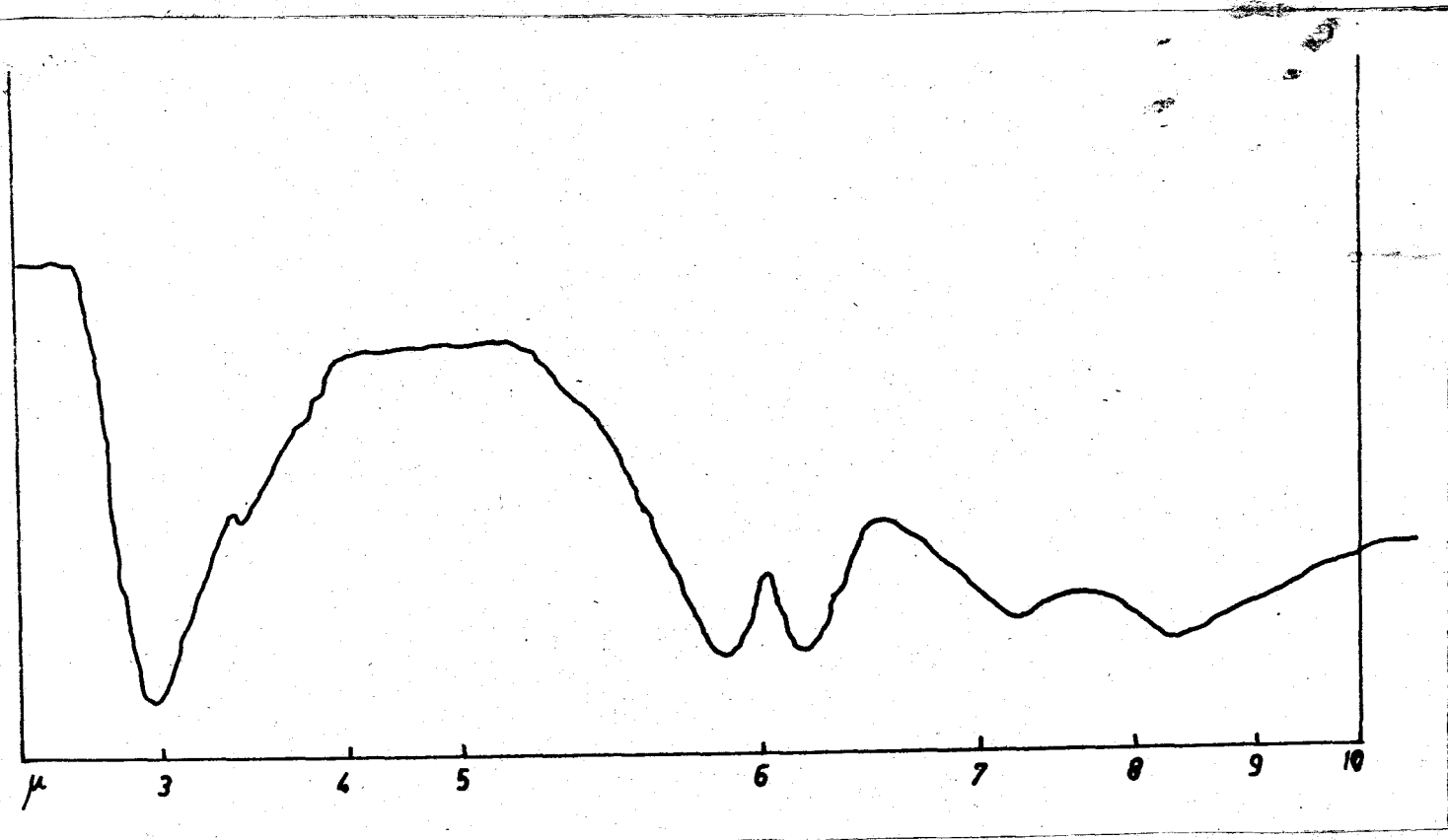


Fig. 17 Espectro de absorciòn en el infrarrojo de ácidos fulvicos tratados con AlLiH_4 y lavados con ácido clorhídrico.

Para comprobar esto último, precipitamos ácidos fulvicos con Cl_3Al a pH entre 3 y 4, obteniendo el espectro de infrarrojo de la sal resultante, que se muestra en la fig 18. Puede observarse que este espectro es idéntico al de la fig. 16.

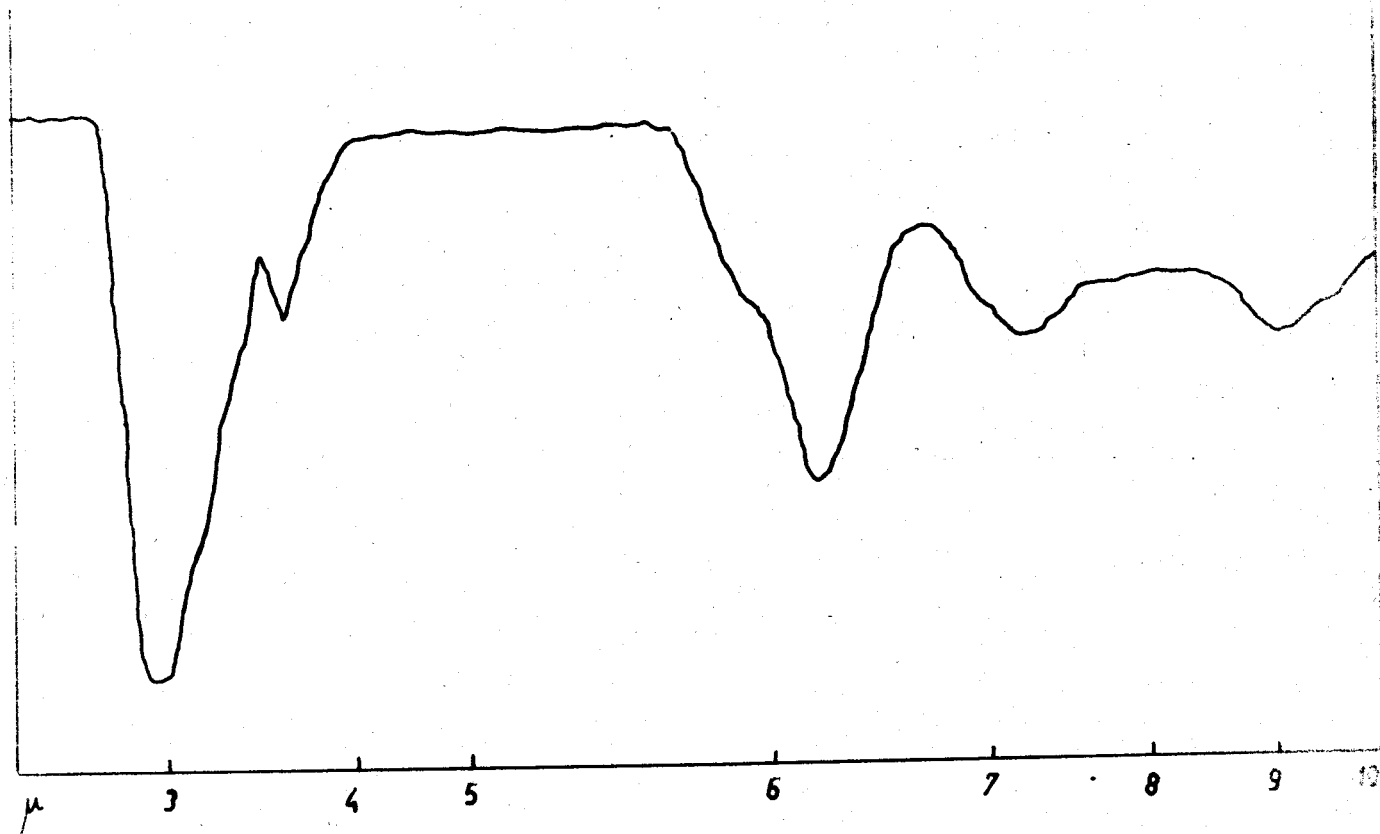


Fig. 18 Espectro de absorción en el infrarrojo de la sal de Al de los ácidos fulvicos.

En consecuencia puede concluirse ~~que~~ tanto en el tratamiento con AlLiH_4 como con Cl_3Al , la formación de la sal de Al de los ácidos fulvicos origina un desplazamiento de la banda de $5,85 \mu$ a la región de $6,1 \mu$ y $7,2 \mu$ con lo que el espectro se asemeja al del material que hubiera sufrido una verdadera reducción.

En vista de este resultado se efectuó una reducción experiencia con diborano, aumentando el tiempo de reacción a 4 semanas. Al cabo de ese tiempo se decantó el diborano, se añadió agua, se destiló el resto de THF y, para eliminar el ácido bórico, se dializó durante una semana (de esta manera

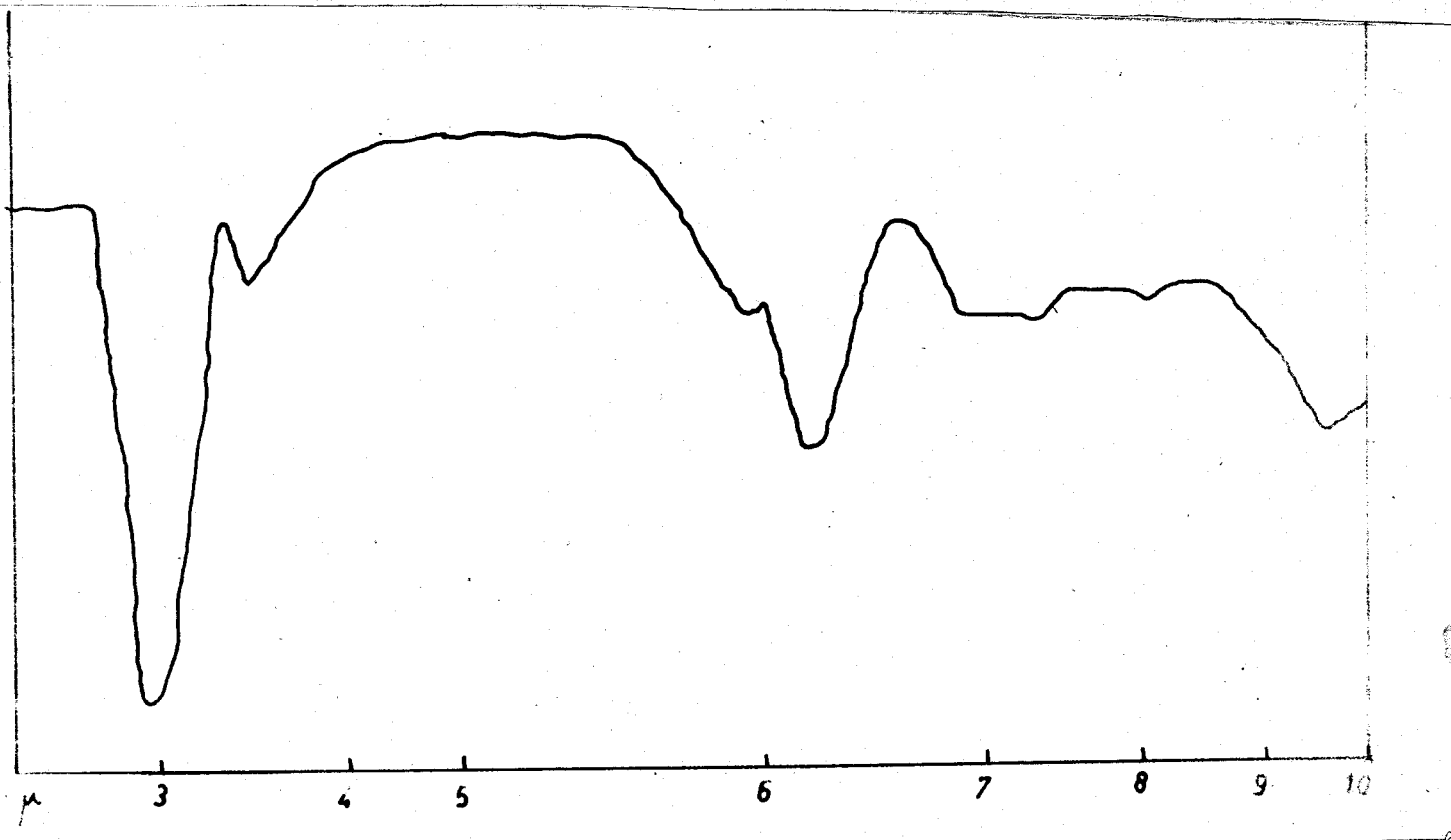


Fig. 19 Espectro de absorción en el infrarrojo de ácidos fulvicos después de 4 semanas de reducción con diborano

el rendimiento es menor, puesto que una fracción, la de menor peso molecular, pasa a través de la membrana, pero los ácidos fulvicos se encuentran totalmente libre de ácido bórico). El espectro de infrarrojo de este material se muestra en la fig. 19 .

Se observa que la banda correspondiente a la absorción del grupo carboxilo ha desaparecido en su mayor parte permaneciendo solo un pequeño resto, que como se indicó en otro lugar podría atribuirse a las quinonas.

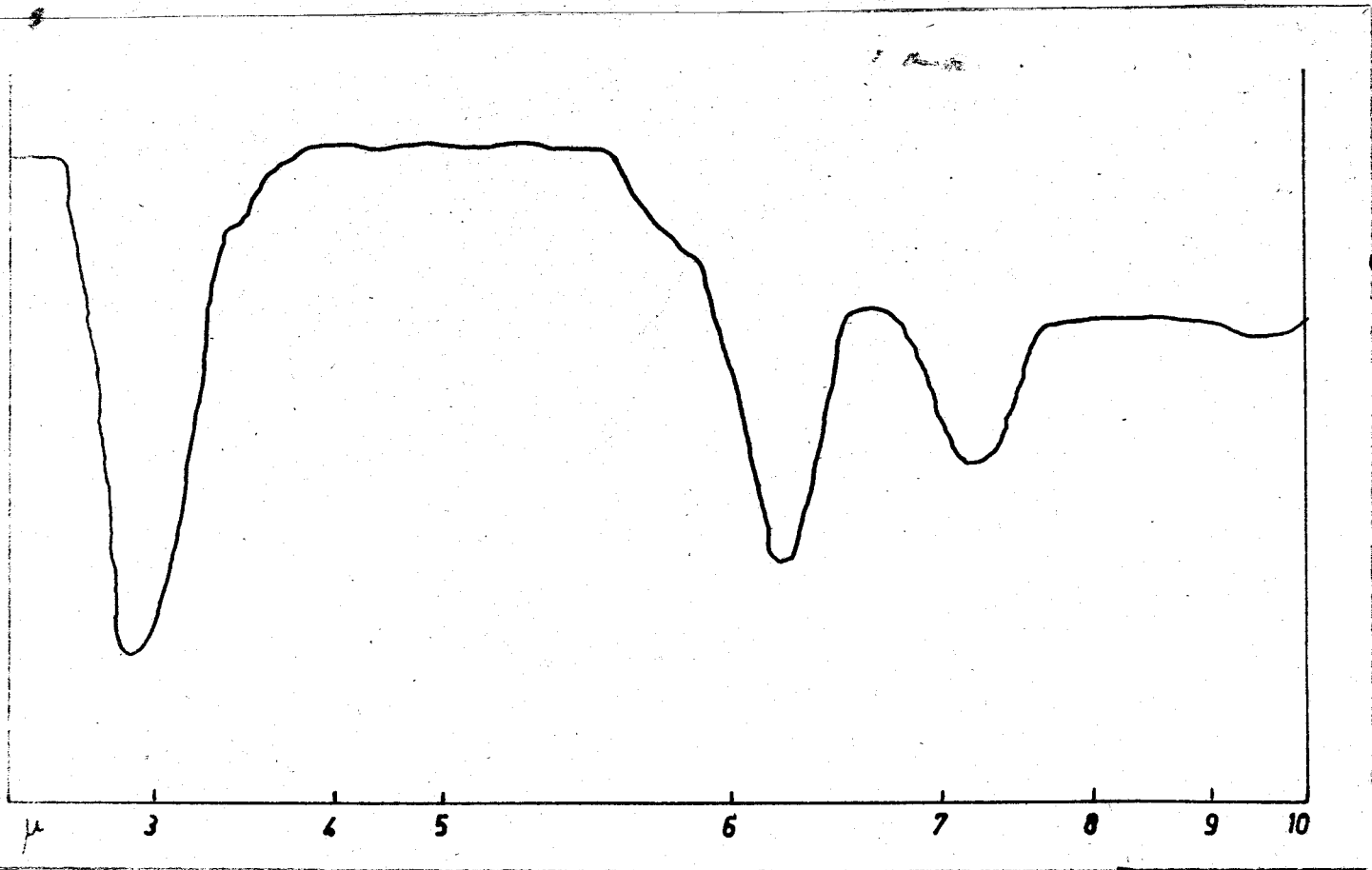


Fig. 20 .Espectro de absorci3n en el infrarrojo de la sal s3dica de los acidos fulvicos.

Si se estudia el espectro de infrarrojo de la sal s3dica del material original (fig. 20), se observa que existe tambi3n una peque1a absorci3n a $5,85 \mu$ que no puede atribuirse a los grupos carboxilo, ya que estos han sido neutralizados (banda desplazada a $6,1 \mu$ y $7,2 \mu$)

No obstante la banda que se observa a $5,85 \mu$ en la fig. 19 es mayor que la correspondiente en el espectro de infrarrojo de la sal s3dica (fig.20).

Los ensayos anteriores de reducción, se efectuaron a la temperatura ambiente y con el matraz de reacción expuesto a la luz. Cada tres días fuè necesario realizar una nueva adición de diborano, ya que este se descomponía al cabo de este tiempo.

Como se indicó en otro lugar, el diborano es estable a 0 °C, en tanto que a temperatura ordinaria se descompone lentamente. A 0 °C, sin embargo, no tiene lugar la reacción de reducción.

Como la reacción de descomposición podía ser catalizada por la luz, efectuamos otros ensayos en las mismas condiciones de temperatura, pero quitando el matraz de reacción de la acción de la luz, conservándolo dentro de un desecador de color topacio y en la oscuridad. Al cabo de una semana se tomó una parte del precipitado, se hidrolizó y dializó, obteniéndose el espectro de infrarrojo que se muestra en la fig.

nº 21

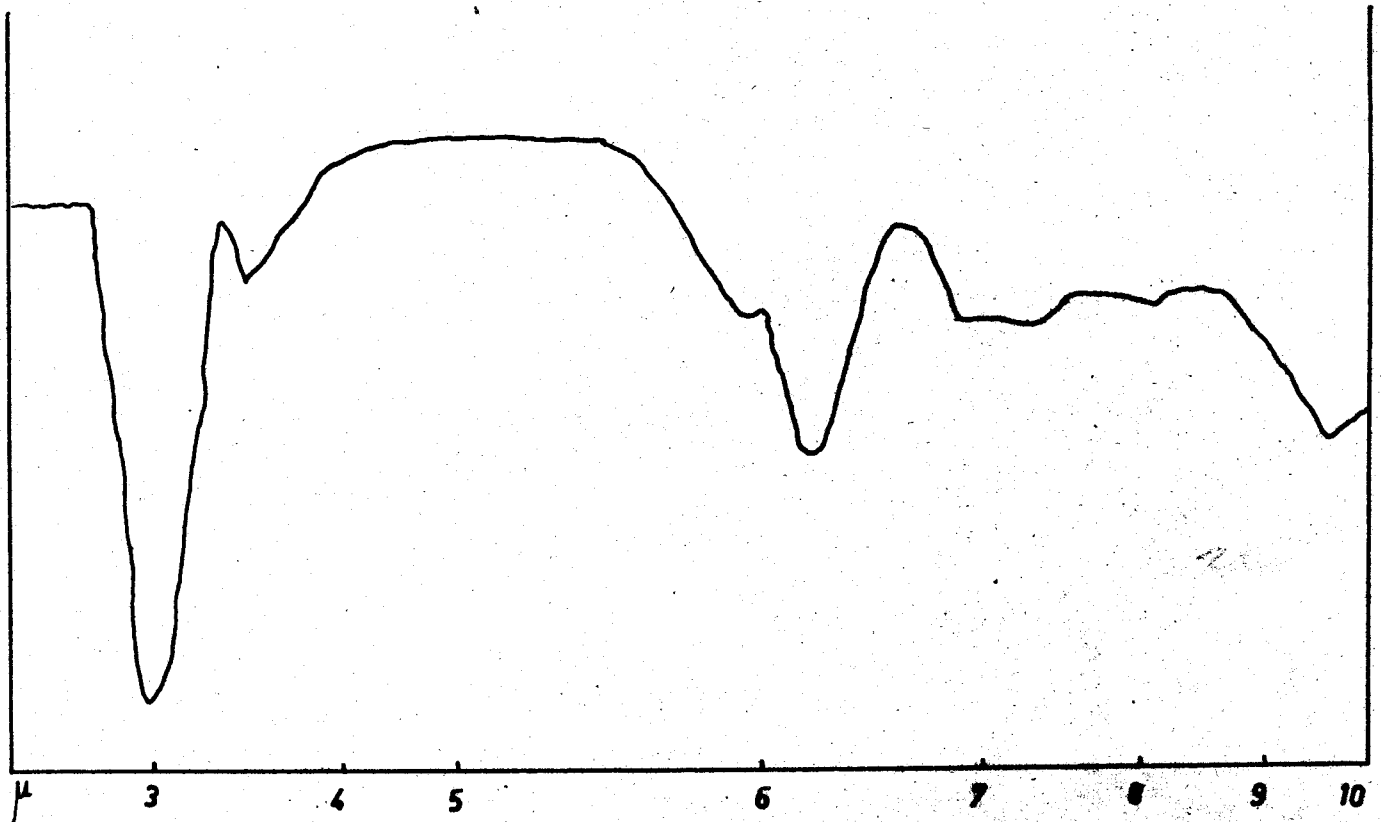


Fig. 21 .Espectro de absorción en el infrarrojo de ácidos fulvicos después de la reducción con

Si se compara este espectro de infrarrojo con el realizado tras la reducción durante 4 semanas a la luz (fig. 19), se observa que el grado de reducción alcanzado es en ambos casos idéntico. Nuevas experiencias en un tiempo de reacción de tres semanas (durante las cuales no hubo necesidad de añadir nuevo diborano), y en la oscuridad, eliminando luego el exceso de diborano y realizando una diálisis posterior, dieron un producto cuyo espectro de infrarrojo se encuentra en la figura 22 .

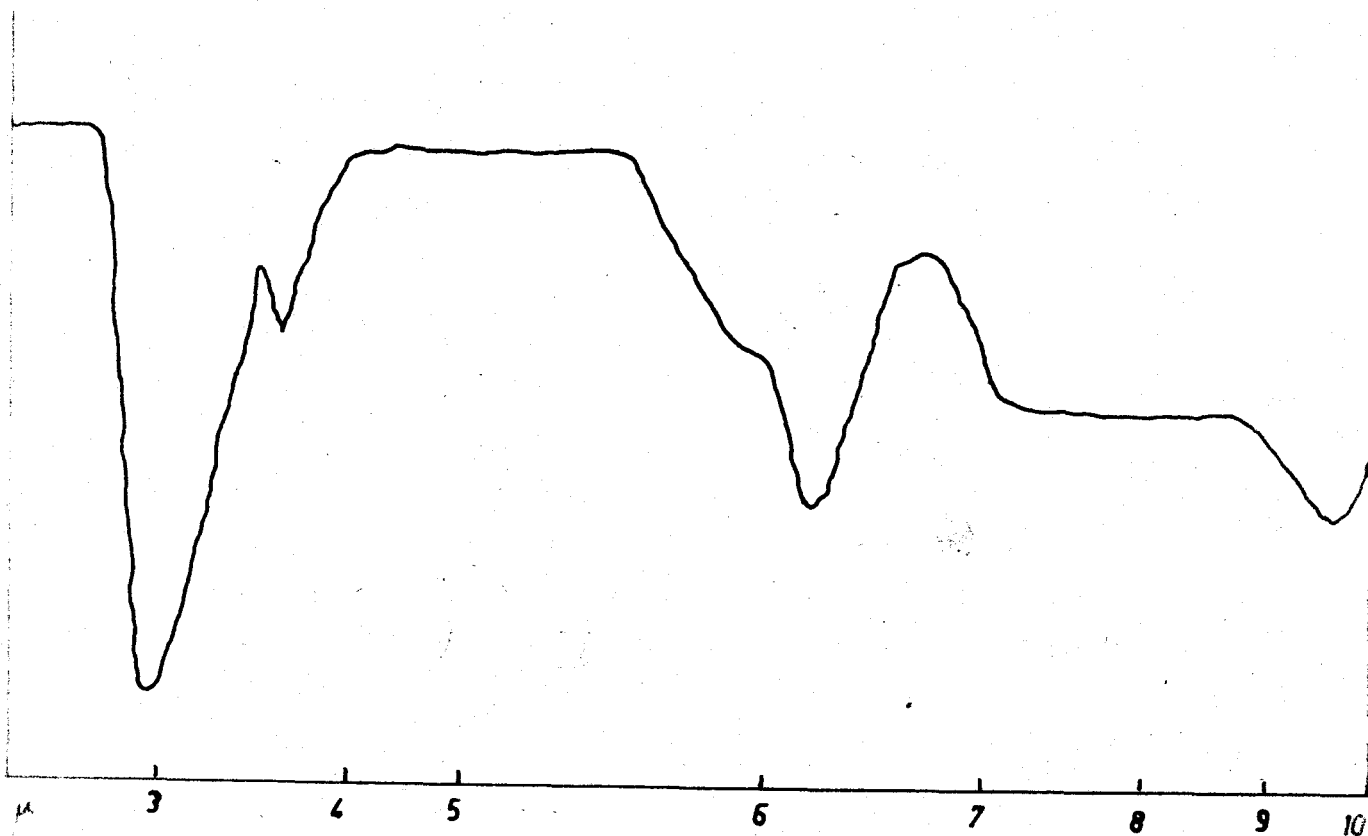


Fig. 22 .- Espectro de absorción en el infrarrojo de ácido fúlvico después de la reducción con diborano 4 semanas a la oscuridad

Comparando este ultimo espectro de infrarrojo, con el de la sal sódica del material original (fig. 20), se observa que la banda de $5,85 \mu$ ha sufrido una disminución importante en ambos casos. No obstante permanece todavia un resto de absorción que no pudo eliminarse a pesar de nuevos aumentos del periodo de reducción.

En el producto así reducido, se determinó la acidez por medio de reacción con hidróxido bórico (como anteriormente en el material original) obteniéndose en este caso un valor de $4,4 \text{ meq/gr}$ (véase la tabla nº).

Se obtuvo también el espectro de absorción a la luz ultravioleta del material original y del resultante después de la reducción con diborano. Ambas gráficas y la diferencia en absorción entre ellas se encuentra en la figura nº 23 , obteniéndose en ambos casos curvas indiferenciadas sin máximos ni mínimos.

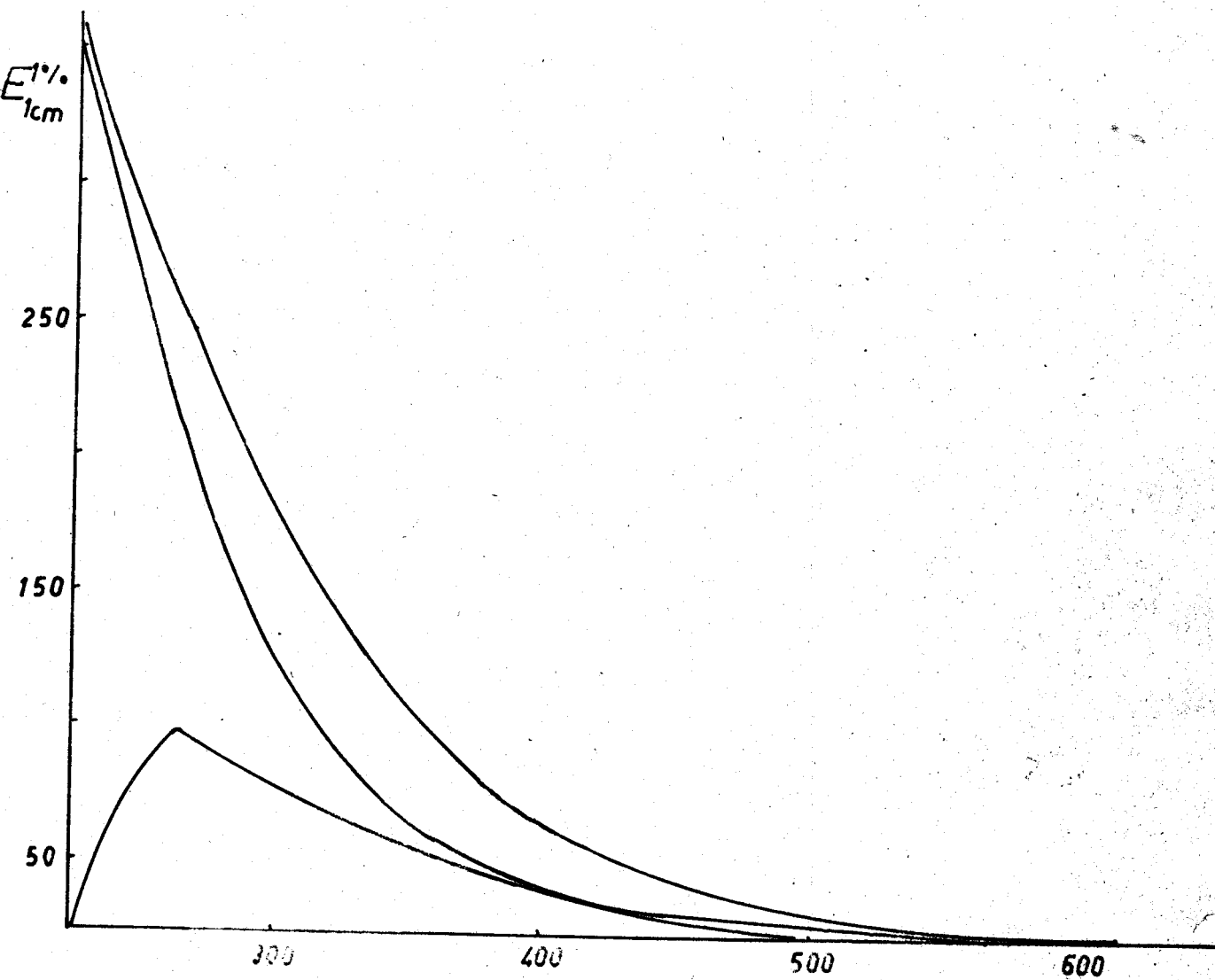


Fig. 23 .- Espectro de ultravioleta de ácidos fúlvicos y de la misma sustancia después de la reducción con diborano (obteniéndose en buffer de borato pH 11).

A causa de la dificultad que representa para la medida de la absorción de hidrógeno, el tiempo excesivo que se requiere para la reducción con diborano, se realizó esta determinación empleando el borohidruro sódico BH_4Na , sustancia referida en la bibliografía de los agentes reductores del grupo carbonilo y en la determinación cuantitativa del mismo en una gran serie de cetonas, aldehidos y quinonas, como se indicó en otro lugar.

Como en casos anteriores, antes de emplear el reactivo en la reducción de los ácidos fúlvicos, ensayamos y comprobamos su acción en una serie de sustancias modelo. Los resultados se muestran en la tabla nº 13.

Tabla nº 13

Reducción de sustancias modelo con BH_4Na .

Sustancia	peso mg.	tiempo	H ₂ absorbido	H ₂ absor/mol
v Quinona	55	90 min	12,5 ml	1
Morina	60	60 min	4,5 ml	0,98
2,5-dihidroxi-quinona	50	90 min	22 ml	2,5

Los valores obtenidos para las primeras sustancias están de acuerdo con lo que era de esperar, pero la 2,5-dihidroxiquinona presenta un comportamiento anómalo, con un consumo excesivo de hidrógeno. Este fenómeno ha sido ya citado en la bibliografía (82) y atribuido a la hidrogenación de los dobles enlaces de la sustancia.

Los resultados de la reducción de la fracción de ácidos fúlvicos solubles en THF, así como de los productos dializados se muestran en la tabla nº 14.

Tabla nº 14

Todo expresado en meq/gr.

Material	H ₂ activo con diborax no	Acidez total Ba(OH) ₂	Hidroxilos por acetil- lación	Carboxilos acet. baric. (1)-(3)	Carbonilo	Oxigeno	Esqueleto	Carbón Esque.	Relació C/O en esquelet		
	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	(9)	(10)	(11)
D ₂	13,0	12,0	2,0	10,3	11,0	2,5	30	3,5	40,0	29,0	8,5
D ₄	12,4	11,6	3,4	9,9	9,0	2,5	30	6,1	40,5	31,6	5,2
D ₇	10,6	10,2	3,5	8,6	7,1	2,4	28,2	8,1	42,0	34,9	4,3
AF	11,6	11,7	3,6	7,8	8,0	1,0	27,5	6,9	42,0	34,0	4,9
D ₁₀	9,6	9,9	4,4	8,0	5,2	2,4	28,1	10,9	41,7	36,5	3,7
D ₁₂	9,3	9,6	4,9	7,2	4,4	2,4	28,5	12,4	41,2	36,8	2,9
D ₁₃	9,0	8,8	5,6	5,9	3,4	2,4	28,2	13,4	42,0	38,6	2,9
AHP	7,1	8,6	4,3	5,3	2,8	1,9	23,2	11,4	47,5	44,7	3,9

DISCUSION FINAL

Como se mostró en la tabla nº 11, el contenido total de grupos hidroxilo determinados por reacción con hidróxido bórico, y el de los encontrados por reacción con diborano es idéntico, hecho que debe atribuirse a la ausencia de hidroxilos alcoholicos en la molécula de los ácidos fúlvicos (fracción soluble en THF), así como en las fracciones obtenidas por diálisis.

En estas últimas y a medida que aumenta el peso molecular puede observarse una disminución en el número de grupos activos al diborano (tabla nº 14), un aumento en el contenido en hidroxilos acetilables y una disminución en el de carboxilos. El número de grupos carboxilo determinado por diferencia entre los valores de hidrógeno activo encontrados por reacción con diborano y los grupos hidroxilos acetilables, disminuye fuertemente. La diferencia entre los valores determinados por este medio y los hallados por reacción con acetato bórico, son cada vez mayores, sobre todo en las últimas fracciones, donde el contenido en hidroxilos es también grande. Aunque no ha podido ser comprobado por otros medios este hecho puede ser debido a la reacción de otros grupos hidroxilo de carácter ácido con la sal de bario lo cual representaría una limitación del método del acetato bórico en sustancias que contengan muchos grupos de esta naturaleza.

Como se mostró anteriormente la presencia de grupos carboxilo ha sido también puesta de manifiesto por reducción de los ácidos fúlvicos y estudio de los espectros infrarrojo.

Cuantitativamente existe una buena correlación entre el contenido en carboxilos determinados por el método del acetato bórico (para la fracción soluble en THF) y el ha-

Tabla nº 15

Datos de los análisis elementales de la fracción de ácidos fúlvicos original y reducida.

Material	%	D meq/gr	%	H meq/gr	%	O meq/gr	N %	OCH ₃ meq/gr	OH meq/gr	C=O meq/gr
AF	51	42	3,6	36	44	27,5	0,8	0,04	3,6	1
AF-R	57	47,6	5,7	57	35,8	22,4	1,2	0,02	10,5	0
AF-R*	51	42	5,1	51	32	20	-	-	9,4	0

AF-R* Son los reducidos referidos al contenido en C del FS, por ej. $0 = \frac{22,4}{57} = 20$

llado a partir del análisis elemental del material original y de la fracción reducida (tabla nº 15). Al reducirse el grupo carboxilo, tiene lugar la pérdida de un átomo de oxígeno y la ganancia de dos átomos de hidrógeno al pasar a alcohol. En la tabla nº 15 se encuentran el análisis elemental de la fracción original (AF), y la fracción reducida (AFR), así como el de esta última referido a un contenido en carbono igual al del material original (AFR[#]), puesto que la cantidad absoluta de este elemento no varía en la reducción.

Mediante el método del acetato bórico se encuentra un valor de 7,8 meq/gr; y a partir de la pérdida de oxígeno o de la ganancia en hidrógeno (en ambos casos) 7,5 meq/gr. Por análisis del producto reducido y acetilado se encuentra un contenido en hidroxilos de 9,4 meq/gr (tabla nº 15). Si se resta de este valor el número de meq. de OH encontrado en la fracción original tras la acetilación, (3,6 meq/gr), resulta un valor para el contenido en grupos carboxilo de 5,8 meq/gr. Por otra parte si se tiene en cuenta que mediante el borohidruro sódico se ha determinado un grupo carbonilo, hay que corregir de nuevo ese valor en un meq/gr. con lo que resulta un contenido final de 4,8 meq/gr. de grupos carboxilo. Este valor es algo bajo en comparación con el obtenido a partir de los otros datos (7,5 meq/gr), lo que puede deberse a una acetilación insuficiente del producto reducido por el alto contenido de OH acetilables de esta sustancia.

Un resumen de estos datos y los cálculos de grupos encontrados es el siguiente:

meq/gr.

1) Grupos OH totales hallados a partir del hidrógeno desarrollado con diborano	11,7
2) Acidez total medida con hidroxido bórico	11,9
3) Grupos hidroxilos encontrados por acetilación en el material original	3,6
4) Grupos carboxilo calculados a partir de la pérdida de oxígeno	7,5
5) Grupos carboxilo calculados a partir del aumento de hidrógeno	7
6) Grupos carboxilo hallados por el método del acetato bórico	7,8
7) Hidroxilos totales despues de la reducción de la sustancia	9,4
8) Acidez total despues de la reducción	4,4
9) Grupos carbonilo determinados por borohidruro sódico	1

Grupos hidroxilo

1) - 4) = 4,2 meq/gr
1) - 5) = 4,7 "
2) - 4) = 4,4 "
2) - 5) = 4,9 "
1) - 6) = 3,9 "
2) - 6) = 4,1 "
3) = 3,6 "
8) = 4,4 "

Grupos carboxilo

1) - 3) = 8,1 meq/gr
2) - 3) = 8,3 "
1) - 8) = 7,3 "
2) - 8) = 7,5 "
6) = 7,8 "
4) = 7,5 "
5) = 7 "

Grupos carbonilo

mediante BH_4Na 1 meq/gr.

Una nueva determinación del grupo carbonilo en la sustancia ya reducida con borohidruro sódico dió un resultado negativo.

Oxígeno etéreo

Se ha determinado por diferencia entre el oxígeno total y el oxígeno que se encuentra en los grupos funcionales. Así, para un valor de 4,8-7,5 meq/gr. de grupos carboxilo, 3,6 meq/gr. de grupos hidroxilo y un meq/gr. para el grupo carbonilo se encuentran en total de 14,1-19,6 meq/gr de oxígeno en tales grupos, es decir, de 50,5-70 % del oxígeno total presente y quedan por tanto de 8,7-14,1 meq/gr., es decir, de 30-49,5 % de oxígeno que puede encontrarse en forma de oxígeno etéreo.

Quinonas.

A lo largo de todo el trabajo hemos observado diferentes pruebas a favor y en contra de la existencia de grupos quinoideos. Así, tras la reducción total, se metiló totalmente el producto reducido (como se demostró al no haber ningún desarrollo de hidrógeno al efectuar la reacción con diborano) y el contenido en metoxilo fué idéntico al del material original totalmente metilado.

Los ácidos fúlvicos tras la reducción son algo menos coloreados que el producto original, aunque ambos materiales muestran un espectro de ultravioleta prácticamente idéntico (fig. nº 23). Ambas gráficas muestran una pequeña diferencia (véase figura nº 23, curva inferior) cuyo máximo se presenta para una longitud de onda que corresponde a la máxima absorción para el grupo $\text{C} = \text{O}$ aunque este efecto puede atribuirse igualmente al grupo carboxilo. Por ello las teorías de Zetsche y Reinhardt (95) y Forsyth (35) de que mediante

la reducción de los ácidos fúlvicos se puede poner de manifiesto la presencia de quinona, no ha podido ser comprobado en nuestro trabajo.

Una fracción de ácidos fúlvicos que fueron previamente reducidos durante una semana se disolvió en metanol midiendo luego la absorción de luz (465μ) realizando idéntica medida en soluciones en metanol de la fracción original, de una fracción metilada y de una fracción metilada y luego saponificada.

Se pasó después una corriente de aire durante dos semanas por todas las soluciones, reponiendo el metanol evaporado. Al cabo de ese tiempo se volvió a medir la absorción de luz observándose que mientras que en los otros productos la absorción fué idéntica a la observada primitivamente, en los ácidos fúlvicos reducidos experimentó un aumento del 20 %, lo cual puede atribuirse a una reoxidación de los grupos carbonilo, (quinona ?). Por último la pequeña banda que permanece a $5,85 \mu$ tras la reducción puede deberse asimismo a grupos quinoideos.

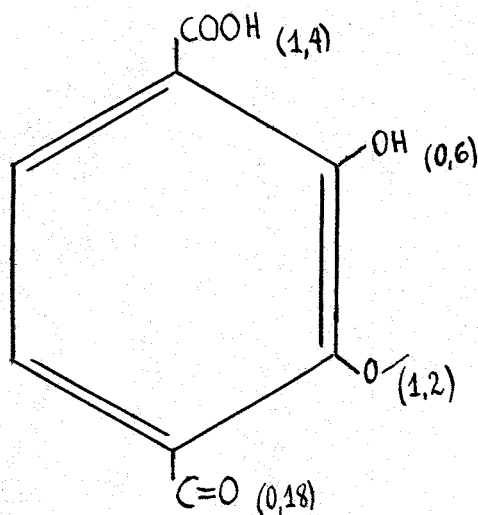
En todo caso y a la vista de los resultados obtenidos, la presencia de grupos quinoideos en la molécula de la fracción de ácidos fúlvicos debe ser mínima.

El análisis de boro en la fracción reducida puso de manifiesto la no existencia de dobles enlaces olefínicos en la estructura de esta fracción.

Para todas las fracciones se determinó el oxígeno restante u oxígeno en el esqueleto (tabla nº 14, columna 8) mediante la sustracción del oxígeno que se encuentra en los grupos funcionales, del oxígeno total (columna 7) expresado en meq/gr. Este oxígeno en el esqueleto aumenta desde 3,5 meq/gr hasta 13,4 meq/gr. en la fracción D_{13} . Ello indica que en esta última fracción cerca del 50 % del oxígeno de la molécula no se encuentra en los grupos funcionales

Como se observa en la tabla nº 14 columna 11, la relación C/O en el esqueleto varia entre 3 y 8,5. Una relación C/O de 6, 4 y 3 daría lugar a 2, 3 y 4 enlaces etéreos respectivamente en el monomero hipotético de la molécula. La fracción D_2 presenta un valor que equivaldría a menos de 2 enlaces etéreos. Estos dos casos extremos nos parecen imposibles, en tanto que los valores de las otras fracciones están dentro de límites admisibles.

De un modo análogo a como en la química del Carbon (87) y en la química de la lignina(17) no se ha establecido una formulación definida, sino que se ha referido siempre una unidad monomérica (C_9 para la lignina), estimamos que sería correcto y conveniente un proceder análogo en la química de la materia húmica, aplicando estadísticamente los valores encontrados. En este sentido proponemos para la fracción de ácidos fúlvicos solubles en tetrahidrofurano la siguiente unidad:



CONCLUSIONES

1) Se ha realizado el estudio de la materia húmica del horizonte B de un podsol (Nante).

Después de la eliminación de los restos de plantas y animales, se extrajo el suelo con ClH 1 N durante 24 horas a 4° C. La fracción de ácidos fúlvicos se precipitó como sal de hierro a pH 4; se centrifugó, lavó y dializó hasta quedar libre de cloruros. La suspensión se trató con resina de cambio (Dowex 50 forma H⁺) durante 24 horas y posteriormente se pasó por una columna de la misma resina, obteniéndose los ácidos fúlvicos al estado libre. Por último fueron secados a vacío y baja temperatura.

Se obtuvo un rendimiento del 40 % de la materia orgánica. El producto estaba libre de hidratos de carbono; el contenido en Nitrógeno era de 0,8 % y de cenizas de 0,6 %.

Los ácidos fúlvicos se extrajeron, 3 veces, con tetrahidrofurano libre de agua, se centrifugaron, concentraron y precipitaron en 9 veces su volumen de éter. La fracción precipitada se filtró, lavó con éter y secó. Se obtuvo un rendimiento del 68 % del total extraído en el párrafo anterior.

2) Una parte de los ácidos fúlvicos así obtenidos se dializó en agua durante 3 semanas, obteniendo las fracciones D₁ hasta D₁₃. Se determinó el peso molecular de estas fracciones por medio de una columna de Sephadex. El peso molecular de la fracción soluble en THF resultó ser del orden de 5.000 y el peso molecular de las fracciones dializadas se encuentra entre 2.000 y 10.000.

3) Todos los métodos fueron especialmente desarrollados con la fracción soluble en THF, determinándose:

a) el hidrógeno activo con diborano

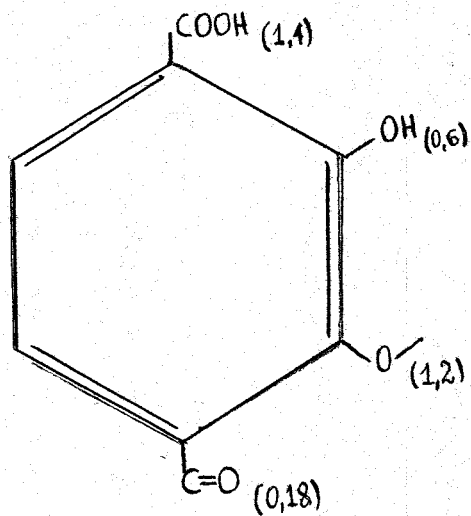
- b) El grupo carboxilo por reducción con diborano determinando el contenido en tales grupos a partir del: aumento en el contenido de hidrógeno, disminución en el de oxígeno y aumento del número de grupos acetilables.
 - c) El grupo carbonilo por reacción con borohidruro sódico.
 - d) la acidez por valoración con NaOH 0,1 N hasta pH 8,5; el grupo carboxilo a través de la reacción con acetato bórico y la acidez total con hidróxido bórico.
 - e) los grupos hidroxilo mediante acetilación con anhídrido acético.
- 4) A partir de los datos experimentales obtenidos puede concluirse que la mayor parte de la acidez de los ácidos fúlvicos se debe a los grupos carboxilo presentes, siendo improbable la existencia de hidroxiquinona y enoles.
- 5) la cantidad de grupos carboxilo disminuye desde la fracción D₂ hasta la D₁₃ (12-2,9), es decir a medida que aumenta el peso molecular.
- 6) La diferencia entre el contenido en grupos carboxilo hallado a partir del hidrógeno producido en la reacción con diborano y el obtenido por reacción con acetato bórico en las fracciones dializadas aumenta desde la D₂ a la D₁₃, es decir, como aumenta el peso molecular.
- 7) El contenido en grupos hidroxilo en las fracciones dializadas aumenta con el peso molecular de las mismas desde 2 a 5,6 meq/gr.

- 8) El contenido en grupos carbonilo permanece constante en todas las fracciones siendo del orden de 2,4 meq/gr
- 9) El contenido en grupos OH neutralizables con $\text{Ba}(\text{OH})_2$ y el de grupos OH activos al diborano es identico, lo que demuestra la no existencia de hidroxilos alcoholicos.
- 10) En la molecula de los acidos fulvicos no existen dobles enlaces olefinicos que puedan ser hidroboraados.
- 11) El numero total de grupos OH acetilables tanto en la molecula de los acidos fulvicos solubles en THF como en las fracciones dializables es:

	meq/gr
AF	3,6
D ₂	2,0
D ₄	3,4
D ₇	3,5
D ₁₀	4,4
D ₁₂	4,9
D ₁₃	5,6

- 12) El numero total de grupos carboxilo determinados por perdida de oxigeno o ganancia de hidrogeno en la fracción de acidos fulvicos tras la reducción con diborano es de 7,5 meq/gr ; y el de grupo carbonilo hallados con borohidruro sódico es de 1 meq/gr.
- 13) La fracción soluble en THF después de la reducción con diborano experimenta un cambio notable en algunas de sus propiedades, tales como solubilidad, acidez e higroscopicidad.

14) Para la fracción de ácidos fulvicos solubles en THF se propone la unidad monomérica siguiente:



1. Anónimo; Chem. Eng. News, 41, 82 (1963).
2. Beckwith, R.S.; Nature, 184, 745, (1959).
3. Beutelspacher, H; Z.Pflan.Düng. Bodenk., 57, 57 (1952).
4. Bradbent, F.E. y Bradford, G.R.; Soil.Sci, 74, 447, (1952)
5. Bremmer, J.M. y Lees, H.; J. Agric. Sec. 39, 274 (1949)
6. Brown, H.C. y Schlesinger, H.I. y Burg, A.B.; J. Am.
Chem. Soc. 61, 573, (1931)
7. Brown, H.C. y Tierney, P.A.; J.Am.Chem.Soc. 80, 1552, (1958)
8. Brown, H.C.; Hydroboration, Benjamin Inc. New York, 1.952.
9. Burges, A.; Symposium on Humic Acid, University College,
Dublin, pag. 53, (1959).
10. Burges, A; Symposium on Humic Acid, University College,
Dublin, pag. 55 (1959).
11. Coffin, D.E y DeLong, W.A.; Trans. 7th Int. Congr. Soil
Sci. Vol. II, 91 (1960).
12. Cram, D.J.; Organic Chemistry, M.C. Graw-Hill Book Com-
pany, Inc. New York, pag. 279, (1959).
13. Chaikin, S.W. y Brown, W.G.; J.Am.Chem.Soc. 71, 122, (1949)
14. Chaikin, S.W.; Anal. Chem. 25, 83, (1953).
15. Chowdri, M.B y Stevenson, F.J; Soil.Sci.Soc. Am. Proc.
21, 508 (1957).
16. Davis, W.D., Mason, L.S. y Stegeman, G; J.Am.Chem.Soc. 71,
2775 (1949).
17. Deuel, H. y Dubach, P.; Helv. Chem. Acta, 41, 1310-1321
(1958).
18. Deuel, H; Schweiz. Zeitschr. für Hydrologie, Vol. XXII,
Fac. 1, (1960).
19. Dragunow, S.S.; Bodenkunde, 7 (1948).
20. Dubach, P.; Diss. E.T.H. Zürich (1958).
21. Dubach, P, Mehta, N.C. y Deuel, H.; Z.Pflan.Düng.Bodenk,
en prensa (1963).
22. Dubach, P. y Mehta, N.C.; Z.Pflan.Düng.Bodenk, en prensa
(1963).

23. Eller, W. y Koch, K.; Bre. Dtsch. Chem. Ges. 53, 1469(1920).
24. Enders, C.; Angew. Che.,. 56, (1943).
25. Erdtman, H. y Granath, M.; Acta Chem.Scand. 8, 811 (1954).
26. Evans, L.T.; J. Soil. Sci. 10, 110 (1959).
27. Farmer, V.C. y Morrison, R.I.; Symposium on Humic Acid,
University College, Dublin, pag. 55 (1959).
28. Feustel, I.C. y Byers, H.G.; U.S. Dept. Agr. Techn. Bull.
532, (1936).
29. Flaig, W. y Schulze, H.; Z. Pflanz.Düng. Bodenk, 58,(1952)
30. Flaig, W. y Beitelspacher, H.; Kalium-Symposium, 81,(1954)
31. Flaig, W.; Scheffer, F. y Klamroth, B.; Z.Pflanz.Düng.
Bodenk, 71, 33 (1955).
32. Flaig, W.; Contribucion al estudio de los ácidos húmicos,
Inst. de Edaf. y Fisiol. Veg. pag. 36 (1955).
33. Flaig, W.; Referencia anterior, pag. 54.
34. Flaig, W.; referencia anterior, pag. 160-161.
35. Forsyth, W.G.C.; J.Agr.Sci. 37,137 (1947)
36. Forsyth, W .G.C.; J.Biochem. 176 , (1947)
37. Fuchs,W y Stengel,W.; Brennstoffchemie, 10, 303, (1929).
38. Gierer, J. y Söderberg, S.; Acta Chem. Scand. 13, 127-137
(1959).
39. Goldschmid, O.; Anal. Chem. 26, 1421 (1954).
40. Hoshstein, J.; Am.Chem. Soc. 71, 305-307 (1949).
41. Hoepner, K.; Ztschr. Unters. Nahr. Genussm, 34, 453-466,
(1917).
42. Jakab, T.; Diss. E.T.H. (1963).
43. Jung, E.; Z. Pflanz. Düng. Bodenk. 37, 1-9 (1946).
44. Kononowa, M.M.; Die Humusstoffe des Bodens, Veb Deuts-
cher, Verlag der Wissench. Berlin, pag. 38 (1958).
45. Kucharenko, T.A., Wwedenskaja, T. y Belgowa, W.; Akad.
d. Wiss. d. UdSSR 86, 3, 601, (1952).
46. Leopold, H.; Brennst, Chem. 9, 215 (1928).
47. Little, D.A. et col.; Anal.Chem. 24, 1843, (1952).

48. Lynch et col.; Symposium on Humic Acid, University College Dublin, pag. 125 (1959).
49. Maillard, I.C.; Compt. Rend, 154 (1911).
50. Martin, D.E. y Raymon, R.J.; Anal.Chem. 34, 1007 (1962).
51. Mehta, N.C., Dubach, P. y Deuel, H.; Z. Pflang. Düng. Bodenk, en prensa (1963).
52. Mehta, N.C.; Dubach, P. y Deuel, H.; Z. Pflang. Düng. Bodenk, en prensa (1963).
53. Meyer, W.; Diss. E.T.H. Zürich (1962).
54. Morton, H. et col. ; Acta Chem.Scand. 15, 384-392 (1961)
55. Natkina, A.I.; Akad. d. Wiss. d. UdSSR, 4 (1936).
56. Mystron, R.F. y Brown, W.G.; J.Am.Chem.Soc. 69, 1197,2548, (1947).
57. Nystrom, R.F. y Brown, W.G.; J.Am.Chem.Soc. 70, 3738 (1948)
58. Oden, S.; Ber.Dtsch.Chem.Ges. 35, 651 (1912).
59. Olleman, E.D.; Anal.Chem. 1425 (1952).
60. Pickard y Littlebury ; J. Chem.Soc. 91, 1973 (1907).
61. Pirret,E.L. y col.; Sci.Proc.Royal, Dublin,Soc.A,1,69,(1960)
- 62.Plunguian, M. y Hibbert, H.; Jour.Amer.Chem.Soc.57,528-536 (1935).
63. Roulet, N. y col.; Z.Pflang. Düng.Bodenk, en prensa(1963).
64. Roulet, N. y col.; Z.Pflang. Düng. Bodenk, en prensa(1963).
65. Ruchti, J.; Diss. E.T.H., Zürich (1962).
66. Rydalenskaja, M. y Tistschenko, W.;Bodenkunde Nr 10(1944).
67. Scheele, W.;Kolloid Beihefte, 46, 97, (1935).
68. Scheele, W.;Kolloid Beihefte, 46, 368 (1935).
69. Scheffer, F.; Humus und Humusdüngung (pag. 57).
70. Scheffer, F.; Humus und Humusdüngung (pag. 56).
71. Schlesinger, H. y Brown, C.; J.Am.Chem.Soc. 75,192, (1953)
72. Schlesinger, H. y Brown,C.;J.Am.Chem.Soc.75, 192 (1953).
73. Schlesinger, H. y Brown,C.;J.Am.Chem.Soc.75, 195 (1953).
74. Schmidt, O. y Atterer, M.; Ber.d.Dtsch.Chem.Ges.60,1671, (1927).

75. Schmuck, A.A.; Trudy Kubans Selskikhoz.Inst.2, 1-92 (1924)
76. Schreiner, O. y Shorey E.C.; U.S. Dept. Agric. Bur. Soil. Bull.
74, (1910).
77. Stadnikow, G. y Korschew, P.; Kolloid-Z.47, 137 (1929).
78. Steelink, C. y col.; Simposium on Humic Acids, pag. 59.
79. Stevenson, F.J. y col.; Soil. Sci. Soc. Am. Proc. 17, 31 (1953).
80. Stevenson, F.J.; Soil. Sci. 93, 298, (1962).
81. Stock, A.; Hydride of Boron and Silicon. Cornell University Press, Ithaca, New York (1957).
82. Studebaker y col.; Ind. Eng. Chem. 48, 162 (1956).
83. Tinsley, J. y Salan, A. Soil and Fertilizers, 24, 81 (1951).
84. Tistchenko, W. y Rydalewskaja, M.; Akad. d. Wis. d. UdSSR. 4 (1936)
85. Ubalđini, J.; Brennst. Chem. 18, 273, (1937).
86. Van Dijk, H.; Symp. on Humic Acids. pag. 163.
87. Van Krevelen, D.W. y Schuzer, J.; Coal Science. Elsevier
Amsterdam (1957).
88. Waksman, S.A.; Humus Organic Chem. Comp. Am. Imp. in Nature,
Baltimore (1938).
89. Welte, E. y Col.; Naturwissenschaften, 41, 334, (1954).
90. Willisttatter, R. y Cremer, K.; Ber. Dtsch. Chem. Ges. 43,
• 2976 (1910).
91. Wright, J.R. y Schnitzer, M.; Nature, 184, 1462 (1959).
92. Wright, J.R. y Schnitzer, M.; Soil. Sci. Vol. II, 120 (1959).
93. Wright, J.R. y Schnitzer, M.; Trans. 7th. Int. Congr. Soil.
Sci. Vol. II, 120, Madison, 1960; Nature, 190 (1961).
94. Zetsche, F. In Klein Handbuch, d. Pflanzenanalysen 293,
328 (1932).
95. Zetsche, F. y Reinhart, H.; Brennst. Chem. 20, 84-87, (1939).
96. Ziechmann, W.; Diss. Landw. Fak. Göttingen, (1954).

