

Joaquín Romero López

Evaluación del potencial del
carbón para su uso como
fertilizante con micronutrientes
para el suelo

Director/es

Gil Martínez, Antonia
Pallarés Ranz, Javier

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

EVALUACIÓN DEL POTENCIAL DEL CARBÓN
PARA SU USO COMO FERTILIZANTE CON
MICRONUTRIENTES PARA EL SUELO

Autor

Joaquín Romero López

Director/es

Gil Martínez, Antonia
Pallarés Ranz, Javier

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Escuela de Doctorado

Programa de Doctorado en Energías Renovables y Eficiencia Energética

2020

*Evaluación del potencial del carbón
para su uso como fertilizante con
micronutrientes para el suelo*

AUTOR: JOAQUÍN ROMERO LÓPEZ

DIRECTORES:

ANTONIA GIL MARTINEZ

JAVIER PALLARES RANZ

OCTUBRE DE 2020

A Julia e Irene

Agradecimientos

En primer lugar quiero darles las gracias a mis directores Antonia y Javier por la ayuda prestada pero más aún por la forma en que me han orientado ante situaciones complicadas en este largo recorrido hasta conseguir la meta, GRACIAS.

También quiero poner unas líneas para mis compañeros de I+D, Julia, Esther, Ramón Ignasi, que con sus consejos y ayuda también me han facilitado realizar esta tesis..

A Laura, que no sé si es un departamento o todos son de ella, siempre ahí para lo que necesites, que fácil es trabajar contigo.

Y como no al departamento Desarrollo, parte de este trabajo os pertenece, gracias por aguantarme y quiero nombrar a todos Eva, Ari, Laura, Marta, Nerea, María y Ana por un lado y por el otro a la gente de la D, Sergio R, Mario y Miriam, que aunque lleváis poco tiempo se agradece el apoyo.

Quiero resaltar a Inmaculada C D T L y del U, ya ha llovido desde que nos conocemos y es un honor trabajar contigo, a la "Ferrer" por sus largas charlas, ayuda y consejos, eso sí, a cabezonería no le gana nadie, Carlos, hace poco que trabajamos juntos, pero es un placer, ya que me has ayudado mucho para que yo pudiera avanzar en este proyecto y una cosa, deja ya de renegarme, Miguel Ángel, aunque desde la distancia, siempre es agradable escuchar tus consejos y Bego, mi Bego ya sabes que a partir de ahora con más tiempo, el "purinetas team" va estar a tope.

Marcus, grande, aunque no por el tamaño, grande en todo lo demás, solo puedo decir que eres un crack y que eso que dicen que sabes jugar a la morra, todavía yo no lo tengo muy claro.

Dani, llevas poco tiempo pero de verdad te agradezco tu apoyo y a seguir con las charlas y revisiones con los cafés de las 6:30 horas de la mañana, nuestras mujeres al final nos acabaran echando de casa, el único pero que puedo decirte, cámbiate de equipo, no puedo hablar de fútbol contigo.

A la gente de Industrial de las diferentes plantas que me dejáis jugar de vez en cuando con ellas, Gloria, Natalia, Olga, Susana, Carlos, etc.

Miguel y Toni, del Club Organia, esos ratos después de las reuniones son una motivación, ya que me hacen desconectar, de todo lo que tenía que hacer, gracias.

A mis ayudantes de averías José Félix y Capellán, siempre estáis cuando se os necesita

Especial mención a Sergio, ya que su capacidad de motivación ante las situaciones más complicadas, me ha permitido perseverar y finalizar este trabajo.

A mi familia, desde mis padres, abuelos, mi hermano, pasando por mi suegra, cuñadas y cuñados y como no a mis sobrinos Hugo, Ainhoa, Samuel, Bea y Aroa.

Por último y los más importantes Julia e Irene, mis faros en la mar, sin vosotras esto no lo hubiera conseguido, quiero agradecer vuestra comprensión por los fines de semana encerrado después de estar toda la semana trabajando, por aguantar mi genio cuando recibía un mail (especialmente de Javier) y los ratos que estaba con vosotras en cuerpo, pero no estaba en mente.

Irene espero que cuando ya hayas aprendido a leer y leas esto, se te haya olvidado todas las veces que me has dicho de “montar historias” y te he dicho que no podía o que no tenía muchas ganas así como muchas otras cosas que no he podido hacer contigo.

Julia, ya llevas tres dedicatorias, te prometo que esta es la última, ya no me meto en ningún jardín más, es momento de empezar a disfrutar esta nueva situación que se presenta, que ya nos tocaba. Aunque ya me conoces desde hace más de 20 años y lo de estar quieto, no va conmigo, pero lo voy a intentar.

Supongo que me dejaré a alguien, por si acaso, agradezco a todos los que en algún momento en este trabajo me han ayudado, escuchado, etc., para poder continuar hasta el fin de este trabajo.

ÍNDICE

ACRÓNIMOS	4
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	2
SUSTANCIAS HÚMICAS EN LA AGRICULTURA	6
1.1.- FERTILIZACIÓN EN LA AGRICULTURA.....	6
1.1.1.- Fertilidad del suelo	6
1.1.2.- Nutrientes y Fertilidad	9
1.1.3.- Sustancias Húmicas y Fertilidad Del Suelo.....	15
1.1.4.- quelatación y complejación de sustancias húmicas en agricultura	19
1.1.4.1 Uso de sustancias húmicas en tratamiento de deficiencias de micronutrientes (Fe, Mn y Zn)	20
1.1.4.2.- Uso de sustancias húmicas en remediación	23
1.2.- ORIGEN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS.	28
1.3.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS	34
1.3.1.- Extracción alcalina	35
1.3.2.- Extracción con solventes	38
1.3.3.- Método alcalino con resinas catiónicas	39
1.3.4.- Métodos mixtos de extracción	40
1.3.5.- Conclusiones de los diferentes métodos de extracción.	43
1.3.6.- Revisión de patentes	45
CAPÍTULO 2.....	67
2.1.- MATERIALES Y REACTIVOS	71
2.1.1.- Equipos de laboratorio	71
2.1.2.- reactivos de laboratorio.	76
2.2.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	78
2.2.1.- Análisis del rendimiento en el proceso de extracción de ácidos húmicos	78
2.2.2.- Análisis del porcentaje de complejación	80
2.2.3.- Análisis del porcentaje soluble de micronutrientes (Fe, Mn, Zn, CU, ...)	81
2.2.4.- Análisis del efecto fotoeléctrico	82
2.2.5.- Diseño de experimentos para la activación de extractos húmicos.....	83
2.2.6.- Estudio de la eficiencia agronómica del producto obtenido	100
CAPÍTULO 3.....	111
3.1.- ESTUDIO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBÓN/LEONARDITA A SUSTANCIAS HÚMICAS.	112
3.1.1.- Proceso de reducción del tamaño de partícula	115
3.1.2.- Proceso de oxidación del carbón	121

3.2.-ESTUDIO DE ACTIVACION DE EXTRACTOS HÚMICOS EN SUSTANCIAS HÚMICAS CON ALTA CAPACIDAD DE COMPLEJACIÓN.	128
3.2.1.- Resultados obtenidos en el estudio de la complejación de hierro.	129
3.2.2.- Resultados obtenidos en el estudio de la complejación de manganeso	138
3.2.3.- Resultados obtenidos en el estudio de la complejación de cinc.	144
3.2.3.1.- Análisis estadístico de los resultados del estudio de la complejación de cinc	145
3.2.4.- Conclusiones	148
3.3.- ESTUDIO DE EFICIENCIA AGRONÓMICA DEL PRODUCTO OBTENIDO COMO COMPLEJO DE HIERRO FRENTE A UN PRODUCTO COMERCIAL.	151
3.3.1.-Ensayos en cámara de cultivo	151
3.3.2.-Ensayo en campo	156
CAPÍTULO 4	164
4.1.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES	165
4.1.1.- Extracción de sustancias húmicas	165
4.1.2.- Activación de las sustancias húmicas para la potenciación de la complejación de micronutrientes.	167
4.1.3.- Ensayos de eficacia del nuevo fertilizante	169
4.2.- CONTRIBUCIONES PRINCIPALES DE LA INVESTIGACIÓN	169
4.3.- PERSPECTIVAS FUTURAS	170
BIBLIOGRAFÍA	174
ÍNDICE DE TABLAS	192
ÍNDICE DE FIGURAS	194
ÍNDICE DE ECUACIONES	198

ACRÓNIMOS

Abs	Absoluta.
AF	Ácidos fúlvicos.
AH	Ácidos húmicos.
Å	Amstrongs
Atm	Atmósfera.
BOE	Boletín Oficial del Estado.
Ca	Calcio.
Cu	Cobre.
DCM	Diclorometano.
EDDHA	Etilenediamino-N,N'-bis (ácido-2-hidroxifenylacetico).
EDTA	Ácido tetra acético de la etilendiamina
EH	Extractos húmicos.
Fe	Hierro.
FTIR	Fourier-transform infrared spectroscopy. Espectroscopía de infrarrojos por transformada de Fourier.
HAP	Hidrocarburos Aromáticos Policíclicos.
ICP-OES	Plasma de Acoplamiento Inductivo con detector Óptico.
IHSS	International Humic Substances Society.
K	Potasio.
KOH	Hidróxido de potasio.
MLR	Multiple Linear Regression. Regresión lineal múltiple.

MCPA	2-metil-4-clorofenoxiacetato potásico.
MeOH	Metanol, CH ₃ OH.
Mesh	Tamaño de malla.
Mg	Magnesio.
Mn	Manganeso.
MO	Materia Orgánica.
MS	Mean square. Cuadrado medio.
N	Nitrógeno
NaOH	Hidróxido de sodio.
Na₄P₂O₇	Pirofosfato de sodio.
N_T	Nitrógeno total.
P	Fósforo
PLS	Partial Least Squares. Mínimos cuadrados parciales.
ppm	Partes por millón.
Psi	Pounds per Square Inch.
RD	Real Decreto.
RSD	Relative Standard Deviation. Desviación estándar relativa.
SD	Standard Deviation. Desviación estándar.
SLHA	Sustainable Liquid Humic Acid.
SMS	Sobre muestra seca.
TNT	Trinitro tolueno.

UE Unión Europea.

VOC Compuesto orgánico volátil.

Zn Cinc.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

En el último siglo se han registrado aumentos espectaculares de la producción agrícola, duplicándose la productividad en el periodo comprendido entre 1908-2008. Si bien, estimar la proporción exacta de aumento que es debida a la introducción de los fertilizantes minerales es una tarea compleja, ya que de manera paralela también han influido factores tales como la mejora en las técnicas de cultivo, la mecanización de las labores del campo, la mejora genética de las variedades vegetales y los pesticidas; se acepta que el desarrollo de los fertilizantes, por sí solos, han solventado las necesidades alimentarias de más de la mitad de la población.

Los beneficios de los fertilizantes minerales son incuestionables, por ejemplo, en el caso del trigo, principal cultivo de cereal en Europa, su aplicación ha permitido incrementar su productividad en más de un 70%, alcanzando una producción neta de más de 150 millones de toneladas de grano al año. Adicionalmente, el aumento de productividad asociado a la aplicación de fertilizantes minerales ha evitado que muchos ecosistemas naturales se convirtieran en tierras de cultivo. Sin embargo, diferentes evaluaciones realizadas han identificado a la agricultura como la principal fuente de nitrógeno (N) liberado al medio ambiente, detectándose importantes incrementos en la liberación de N en forma de amoníaco (NH_3), nitratos (NO_3^-) y óxido nitroso (N_2O), responsables de importantes problemas medioambientales y de salud pública.

Es indudable que el uso de fertilizantes industriales seguirá siendo el motor que permita satisfacer las necesidades crecientes de alimentación. Para mediados de este siglo se espera que la población mundial alcance los 9 mil millones de habitantes (2 mil millones más que en la actualidad), lo que seguramente duplicará la demanda de alimentos, considerando también el aumento del poder adquisitivo de la sociedad. Ante tal panorama, es un hecho que cada vez se incorporará más nitrógeno reactivo al medioambiente y, por lo tanto, se deben generar iniciativas que permitan optimizar el uso de los fertilizantes, disminuyendo así los riesgos de contaminación sobre las aguas, suelos y atmósfera.

Por estas razones, la producción agrícola debe orientarse cada vez más hacia una «agricultura sostenible», la cual preserve los recursos naturales, reduzca las emisiones de gases de efecto invernadero y mantenga los valores de biodiversidad. Un aspecto fundamental para la sostenibilidad de la agricultura es el mantenimiento de unos niveles adecuados de materia orgánica en los suelos. Una alternativa coherente con la problemática actual es la que se aborda en el presente trabajo y que consiste en el desarrollo de fertilizantes en base a carbón con las modificaciones necesarias para que su aplicación sirva de aporte de

materia orgánica incorporable a la estructura del suelo, así como de nutrientes. Asimismo, para cubrir la demanda de alimentos en las próximas décadas, será necesario ampliar las tierras cultivables, transformando suelos que actualmente no lo son a suelos fértiles donde cultivar alimentos básicos de secano, como el trigo o la cebada. En este sentido, la regeneración de los suelos incorporando materia orgánica de calidad será algo imprescindible.

Para utilizar el carbono procedente del carbón como fuente de materia orgánica, este debe de estar disponible para bien incorporarse a la estructura del suelo, o bien para actuar como fuente de energía para la vida microbiana del suelo. El carbono orgánico soluble es la principal fuente de energía de la biota del suelo, la cual es esencial para la recirculación de nutrientes y su mantenimiento en formas asimilables para las plantas. La microbiota del suelo aumenta y disminuye en función del contenido de materia orgánica disponible.

La sustitución de fertilizantes minerales por fertilizantes orgánicos proporciona numerosos beneficios ambientales, como la reducción del uso de sistemas de producción que requieren un consumo elevado de energía y recursos y el reciclaje de nutrientes y materia orgánica a partir de diferentes subproductos. Estos aspectos han impulsado que la Unión Europea (UE) trabaje en la implantación de un campo de juego único definiendo un marco regulatorio que incorpore los fertilizantes orgánicos. Así se permite su acceso al mercado comunitario con garantías ya que la gran divergencia existente entre las diferentes legislaciones nacionales limita su competitividad en los mercados internacionales y provoca que predomine el consumo local de los mismos. Al mismo tiempo, se da respuesta a la propia evolución del mercado tecnológico que cada vez presta más atención a estos productos.

El objetivo final es contribuir a un sistema productivo más eficiente aproximando el modelo de economía circular, que pretende impulsar un crecimiento económico sostenible y la generación de nuevos empleos. Uno de los pilares de este modelo es la reutilización de materiales que hasta ahora se desechaban, introduciéndolos de nuevo en el sistema productivo como materias primas o recursos de valor.

La recuperación de nutrientes y materia orgánica en materias primas secundarias con valor añadido convierte un problema de gestión de residuos en una oportunidad económica y reduce la vulnerabilidad del sector agroganadero ante fluctuaciones de los mercados de materias primas. En la actualidad, en torno al 90% del fósforo utilizado para los fertilizantes sintéticos en la UE es importado, cuando la tercera parte podría recuperarse de los lodos de depuradora, residuos biodegradables y estiércoles. Estos productos podrían llegar a sustituir hasta un 30% de los fertilizantes inorgánicos utilizados en la UE.

La actual normativa en Europa es completamente diferente al resto de países y plantea una nueva forma de fertilizar, sustituyendo fertilizantes inorgánicos por fertilizantes orgánicos.

Con la coyuntura actual el modelo industrial cambia sustancialmente, ya que se requiere de una reconversión total de las plantas para poder adaptarse a materias primas no habituales y fabricar nuevos fertilizantes en base orgánica.

En este punto las sustancias húmicas toman un papel relevante por la naturaleza en la que se encuentra como materia prima y de los tratamientos que las sustancias húmicas requieren para ser aplicadas en el campo como fertilizante. Esta característica permite tener fertilizantes que encajan con la nueva política de fertilización por la que la Unión Europea ha decidido apostar, por ende las sustancias húmicas pasan a un primer plano en la fertilización ecológica.

Las sustancias húmicas son consideradas en los diferentes reglamentos de fertilizantes como sustancias ecológicas, lo que permite utilizarlas para mejorar la calidad del suelo, dotando al suelo de una mejor estructura, una mayor capacidad de intercambio catiónico junto con un aumento en la cantidad de carbono biodisponible para la microbiota del suelo.

El principal origen de las sustancias húmicas es debido a la degradación lenta y paulatina del carbón mediante una oxidación debida a los condicionantes atmosféricos, lo que condicionan mucho su velocidad de transformación de carbón a sustancias húmicas. Otras fuentes secundarias son los debidos a la humificación de los diferentes restos vegetales, siendo en todos los casos procesos con muy bajos rangos de conversión. Por dicho motivo se empezó a trabajar con la fuente de las sustancias húmicas, el carbón y más en especial, el de bajo rango. A estos carbones se les empezó aplicar diferentes tipos de tratamientos para aumentar la cinética de transformación mediante múltiples técnicas más o menos eficientes y con mayor o menor respeto hacia el medio ambiente, cuestión esta última que chocaba frontalmente con una de las virtudes que poseen inicialmente las sustancias húmicas.

Dado que los usos tradicionales del carbón, como la producción de energía eléctrica en centrales térmicas, conllevan, entre otros problemas medioambientales, la emisión de gases de efecto invernadero, su utilización se está viendo reducida en la actualidad, por lo que la propuesta de esta tesis, desarrollando productos fertilizantes de alto valor añadido para el sector agrícola a partir de carbón, constituye una alternativa de valorización de estos recursos autóctonos y una oportunidad para impulsar la reconversión de un sector industrial con gran impacto en las cuencas mineras de la provincia de Teruel. En relación a la obtención de sustancias húmicas a partir de carbón, en las últimas décadas se han llevado a cabo diferentes

investigaciones y se han propuesto diferentes procedimientos de extracción, no obstante, dada la complejidad de estos procesos (relacionada con las características de las materias primas, las condiciones en que se desarrolló el propio proceso y las propiedades finales requeridas en los productos fertilizantes), en la actualidad sigue siendo un campo de investigación abierto con grandes perspectivas de futuro, cuyo reto principal es el desarrollo y optimización de nuevos procesos de extracción, maximizando el rendimiento, la selectividad del proceso y los tiempos de conversión requeridos, todo ello adaptado a un entorno industrial que permita obtener unos productos finales competitivos en el mercado de los fertilizantes.

En este sentido, el objetivo principal de este trabajo es desarrollar un proceso industrial innovador, selectivo, eficaz y competitivo para obtener a partir de carbón fertilizantes basados en sustancias húmicas, que además de servir como fuente de materia orgánica mejorando la fertilidad de los suelos, también actúen como agentes complejantes para la corrección de carencias de diferentes micronutrientes en las plantas, mejorando en conjunto el crecimiento y el rendimiento de los cultivos.

La descripción del trabajo llevado a cabo en esta Tesis Doctoral se presenta en esta memoria estructurada en los siguientes capítulos:

En el Capítulo 1 se realiza una revisión del estado del arte en relación a las sustancias húmicas y los efectos de su aplicación en la agricultura, tanto en su uso como aportes de materia orgánica como en su uso como correctores de carencias. Asimismo, se realizan sendas revisiones sobre los diferentes métodos de laboratorio para la extracción de sustancias húmicas, donde se prioriza la selectividad en la extracción, y sobre las patentes existentes en relación a la extracción de sustancias húmicas, donde se prioriza la eficiencia de extracción, englobando tiempo requerido y rendimiento.

En el Capítulo 2 se lleva a cabo la descripción de los métodos utilizados para efectuar los diferentes análisis de parámetros como son el contenido en extractos húmicos, el contenido de metal complejado así como métodos estadísticos como el test Anova. Estos son tanto métodos oficiales de análisis de fertilizantes, como métodos estadísticos de análisis de datos.

En el Capítulo 3 se exponen los resultados obtenidos con los anteriores métodos en los diferentes escenarios planteados en este trabajo para comprobar y corroborar el efecto de los productos obtenidos frente a productos ya existentes en el mercado. Además, en este capítulo se analizan los resultados de la optimización de variables para obtener un fertilizante con micronutrientes complejados.

Por último, se describen las acciones a futuro en base al trabajo desarrollado y las conclusiones finales.

SUSTANCIAS HÚMICAS EN LA AGRICULTURA

1.1.- FERTILIZACIÓN EN LA AGRICULTURA

1.1.1.- FERTILIDAD DEL SUELO

El crecimiento de la demanda de alimentos que tiene lugar a nivel global obliga a las sociedades a buscar medios para mantener o aumentar la fertilidad de los suelos. Esta se define como la capacidad de un suelo para sostener el crecimiento de las plantas y generar cosechas con un rendimiento óptimo según la IAEA (International Atomic Energy Agency). Un suelo fértil provee a las plantas de los nutrientes necesarios para su desarrollo y, cuando existen deficiencias aún en un solo nutriente, se observa que el crecimiento y el rendimiento de los cultivos se reduce (1).

Para mantener o mejorar la fertilidad del suelo se han utilizado una serie de técnicas a lo largo de la historia. Una de las más antiguas consiste en la aplicación de enmiendas orgánicas, como las provenientes del estiércol de animales o de restos vegetales. Otra técnica es la rotación de cultivos, que se basa en alternar ciclos del cultivo principal con periodos de descanso y con la siembra de cultivos de otras especies, como los de la familia de las leguminosas, lo cual permite reponer el nitrógeno del suelo, para luego volver al cultivo original. En la práctica, estas técnicas, por sí solas, no son suficientes para reponer todos los nutrientes que se extraen por la producción y se requiere la adición de nutrientes derivados de otras fuentes (2).

La fertilización se entiende como el proceso mediante el cual se reponen los nutrientes extraídos del suelo por las cosechas (3, 4). La aplicación de fertilizantes permite obtener incrementos importantes del rendimiento de las cosechas, consiguiendo que los mismos pueden duplicarse e incluso triplicarse, en las condiciones adecuadas, con respecto al cultivo sin fertilizantes (1).

La actividad agrícola convencional incluye cuatro procesos básicos: sembrar, cosechar, limpiar el terreno y preparar el terreno para un nuevo ciclo de siembra. Independientemente del sistema de cultivo, el uso continuo del suelo disminuye lentamente los niveles de materia orgánica y nutrientes, incrementa la erosión, acelera los procesos de mineralización y disminuye la productividad (5).

Particularmente, la aplicación de fertilizantes químicos permitió incrementos importantes de la producción agrícola, lo que a su vez impulsó la utilización de sistemas intensivos. Un efecto de la agricultura intensiva es la degradación de los suelos, definida como la pérdida del potencial de producción debida al deterioro de sus

propiedades físicas, químicas o biológicas, y que tiene graves consecuencias a nivel social, cultural y económico para las sociedades cuya subsistencia depende directamente de la agricultura (6).

La degradación de los suelos trae como consecuencia la pérdida de su potencial de producción. La FAO ha propuesto una clasificación de los suelos degradados en función de los problemas observados. La categoría I, considerada la más frecuente, comprende los suelos que presentan uno o más de los siguientes problemas: erosión, aumento de la salinidad o alcalinidad, acumulación de desechos orgánicos y organismos infecciosos. La categoría II, incluye suelos contaminados con desechos inorgánicos, pesticidas, radiactividad y metales pesados. La categoría III incluye los suelos contaminados con fertilizantes y detergentes (7, 8). Asimismo, la aplicación de fertilizantes en exceso, en un momento inadecuado o sin tener en cuenta las características del suelo y la orografía del terreno, puede tener impactos ambientales significativos (9). De hecho, el empleo abusivo de fertilizantes nitrogenados y fosfatados ha demostrado generar graves problemas de contaminación por la acumulación de niveles anormalmente altos de compuestos de nitrógeno y fósforo en los sistemas de agua dulce cercanos a los lugares de aplicación, tales como ríos, lagos o acuíferos subterráneos. Este fenómeno, conocido como eutrofización, favorece la proliferación de plantas acuáticas y algas y produce diversos cambios en las propiedades químicas del agua, lo que afecta sensiblemente a su calidad para permitir la vida de gran parte de los organismos acuáticos. Cuando la concentración de estas sustancias en el agua supera los límites legales establecidos para agua potable, se limita su utilización para consumo humano (10, 11, 12). Además de la eutrofización en las zonas acuáticas, el enriquecimiento paulatino de determinados nutrientes en el suelo debido a una fertilización inadecuada o excesiva genera desequilibrios en el propio suelo. Dichos desequilibrios son, en cierta medida, responsables de descensos en el rendimiento de las producciones agrícolas. En la actualidad se están creando directivas para el control de la aplicación de unidades fertilizantes en zonas medioambientalmente vulnerables como la Comunidad Valenciana y Murcia, donde las limitaciones han llegado hasta la prohibición y/o limitación de determinados nutrientes principales como el nitrógeno. En estas zonas, el contenido en forma de nitratos y nitritos presente en suelos y acuíferos está provocando graves problemas medioambientales. Estas directrices de control vienen guiadas desde la propia Comisión Europea que pretende controlar de una forma más efectiva el cambio climático, regulando con buenas prácticas en la agricultura.

Por otra parte, la eficiencia en el uso de los fertilizantes es relativamente baja pues gran parte del fertilizante aplicado no llega a las plantas. En el caso del nitrógeno, las pérdidas se estiman entre el 30 y el 60%, dependiendo de las condiciones climáticas, el tipo de suelo y la forma de aplicación (9). Por ejemplo, en el caso de la urea aplicada al voleo, se ha cuantificado una pérdida de hasta el 25% (13). Las pérdidas de las

distintas formas de nitrógeno en los suelos ocurren por volatilización, lixiviación, fijación en materia orgánica y arrastre por la lluvia (14).

En el caso del fósforo, se estima que cerca del 80% del P aplicado al suelo reacciona con aluminio y hierro en suelos ácidos y con calcio en suelos básicos para formar complejos insolubles, limitando su disponibilidad para las plantas. Además, dado que este elemento se acumula en la capa más superficial del suelo, la escorrentía y la erosión lo llevan a las aguas superficiales, donde contribuye a la eutrofización (10, 15, 16).

El impacto ambiental de los fertilizantes químicos ha llevado a algunos países a desarrollar su propia legislación para limitar sus efectos (1). En Europa la normativa que ha armonizado las diferentes directrices en el impacto ambiental es la Directiva 2014/52/UE del Parlamento Europeo, que junto a la Directiva 21/2013 referente al impacto ambiental con el uso de fertilizante, regulan el uso de determinadas sustancias en la agricultura en las diferentes zonas del estado. En España, esta ley 21/2013 ha sido consolidada por la Ley 9/2018 en la que se realiza una evaluación general del impacto ambiental. Anteriormente en España estas regulaciones estaban dirigidas principalmente a la protección de los diferentes acuíferos como es el caso del Real Decreto 261/1996, de 16 febrero, sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias. Con las nuevas directrices las diferentes comunidades autónomas han ido transfiriendo la Ley a sus regiones, como, por ejemplo, la Rioja en el año 2019 mediante un nuevo Real Decreto 127/2019 donde, además de apoyarse en lo ya descrito en el anterior, también delimita las zonas vulnerables de suelo para el uso de fertilizantes. Además de las directivas europeas y leyes establecidas existen otras formas de adecuar los usos de determinadas sustancias como el nitrógeno que, en el año 2007, dentro de la Estrategia Española de Cambio climático y Energía Limpia, se incluyó un plan de reducción de uso de fertilizantes nitrogenados (17).

Los fertilizantes constituyen uno de los principales insumos de la producción agrícola, por lo que la eficiencia de su uso puede ser una fuente importante de ahorro. Cuando se aplica un exceso de fertilizantes, todo el producto que no llega a las plantas tiene un coste que no se revierte en la cosecha. En cambio, si la fertilización es insuficiente, disminuye el rendimiento de los cultivos y se reduce la fertilidad del suelo. En España, se ha propuesto el concepto de la “Fertilización Racional”, combinando el uso de fertilizantes químicos con la utilización de abonos orgánicos derivados de compost y enmiendas orgánicas y con la revisión de prácticas como la rotación de cultivos y el riego localizado. El documento de la Fertilización Racional propone estrategias para los principales cultivos, incluyendo cereales, frutales y hortalizas, entre otros (3). Un manejo apropiado de la fertilización requiere una mejor comprensión de los procesos que originan la degradación del suelo y una evaluación del impacto de las técnicas de conservación (18). La decisión de

aplicar fertilizantes se debe tomar en base a criterios técnicos apropiados, con apoyo de expertos agrónomos y de análisis de laboratorio. Se requiere un conocimiento adecuado de las características físicas y químicas del suelo y de la disponibilidad de nutrientes para poder determinar las cantidades que deben ser aportadas mediante fertilizantes, abonos y enmiendas (1). Si la dosis de fertilizante aplicada se ajusta a las necesidades de los cultivos y a las características del suelo, y se realiza un adecuado manejo del agua y de las técnicas de labranza, se podrá mantener la fertilidad del suelo sin efectos negativos en el medio ambiente (19).

1.1.2.- NUTRIENTES Y FERTILIDAD

Las plantas requieren para su desarrollo óptimo una serie de elementos químicos que deben estar presentes en el suelo en la forma y concentración apropiadas. Cuando estos elementos están presentes en concentraciones inferiores a las requeridas, se generan deficiencias importantes que limitan sensiblemente la productividad de los cultivos y afectan negativamente a la calidad de los productos agrícolas obtenidos.

Un elemento químico es considerado esencial si se requiere su presencia para el metabolismo de la planta en alguna fase del ciclo de vida de la misma. Se han identificado 17 elementos que cumplen con este criterio (20, 21). Los nutrientes, en base a su abundancia relativa en los tejidos vegetales, se dividen en dos categorías principales: los macronutrientes (primarios y secundarios) y los micronutrientes (22).

Los macronutrientes primarios son el nitrógeno (N), el fósforo (P) y el potasio (K) y están normalmente presentes en concentraciones superiores al 0,2% y las plantas los requieren relativamente en grandes cantidades. Estos macronutrientes (NPK) son los componentes principales de los fertilizantes químicos. Los nutrientes secundarios son el calcio (Ca), magnesio (Mg) y azufre (S). Los macronutrientes están asociados biológicamente a procesos fotosintéticos, al equilibrio osmótico y a diversos procesos celulares y rutas metabólicas formando parte de compuestos de bajo peso molecular (aminoácidos, nucleótidos, metabolitos secundarios, etc.) o de macromoléculas (enzimas y otras proteínas, ácidos nucleicos, etc.). Hay otros tres macronutrientes, el carbono (C), el oxígeno (O) y el hidrógeno (H), que son obtenidos por la planta a partir del aire y del agua y son necesarios para la producción y almacenamiento de energía y para el crecimiento celular. El grupo de los micronutrientes es más numeroso, pero los principales son el hierro (Fe), el cinc (Zn), el cobre (Cu), el manganeso (Mn), el boro (B), el molibdeno (Mo) y el cloro (Cl) y su concentración es inferior al 0,01% en base a materia seca. Estos también están relacionados con procesos como la fotosíntesis, con el equilibrio iónico o la síntesis de ácidos nucleicos y actúan como cofactores enzimáticos en numerosas reacciones metabólicas. Cabe destacar que la distinción entre macronutrientes primarios y secundarios y micronutrientes hace referencia a las cantidades que consumen los cultivos y no a que unos sean más

importantes que otros, ya que la falta de cualquier nutriente penaliza el rendimiento (23). Todos los nutrientes son importantes y la planta debe tomarlos en un adecuado equilibrio.

Los nutrientes están presentes en la solución del suelo como cationes o aniones. Los nutrientes que están como cationes son el calcio, como Ca^{+2} , el magnesio, como Mg^{+2} , el amonio, como NH_4^+ , el potasio, como K^+ , el hierro, como Fe^{+2} , el manganeso, como Mn^{+2} , el cinc, como Zn^{+2} , y el cobre, como Cu^{+2} . Otros cationes como el del sodio (Na^+) y el aluminio (Al^{+3}) se encuentran en concentraciones relativamente altas en los suelos y pueden ser absorbidos por las plantas, aunque no constituyen nutrientes para estas. Los nutrientes que existen como aniones son el nitrato (NO_3^-), el sulfato (SO_4^{-2}), el fosfato (H_2PO_4^- y HPO_4^{-2}), el borato (BO_3^-), el molibdato (MoO_4^-) y el cloruro (Cl^-) (24).

En el caso de los fertilizantes sólidos, los nutrientes son absorbidos por las raíces de las plantas a través de la disolución de sus componentes solubles. En el caso de los fertilizantes líquidos, estos componentes ya van disueltos y su aplicación al cultivo resulta más sencilla. Por lo tanto, es esencial que los nutrientes sean solubles para poder ser utilizados por las plantas (25).

Las partículas del suelo pueden mantener los cationes en formas solubles e intercambiarlos con la solución del suelo. La capacidad de intercambio catiónico de un suelo es un parámetro esencial en la caracterización de su fertilidad. Esta depende del complejo arcillo-húmico, formado por las láminas de arcilla provenientes de la roca madre del suelo y por partículas de extracto húmico. Por consiguiente, de manera general, los suelos arcillosos tienden a poseer una mayor capacidad de intercambio de cationes que los suelos arenosos. Debido a la abundancia de cargas negativas, la materia orgánica tiene capacidades de intercambio catiónico altas. Por lo tanto, el extracto húmico integrado en el complejo arcillo-húmico del suelo también tiene un efecto positivo sobre su capacidad de intercambio catiónico. Normalmente, en un suelo fértil, los cationes intercambiables más abundantes son, por este orden, el calcio, el magnesio, el potasio y el sodio, representando los cuatro, al menos, entre el 80 y el 90% del total de la capacidad de intercambio (26).

Los componentes mayoritarios de la biomasa vegetal son el carbono, el hidrógeno y el oxígeno, los cuales provienen del CO_2 y del agua y son utilizados gracias a su transformación en carbohidratos en el proceso de fotosíntesis, el cual desprende oxígeno. Su disponibilidad por lo general no es limitante para la planta y se requieren en grandes cantidades.

Para que un nutriente esté disponible y la planta lo pueda absorber, este debe estar presente en una forma química adecuada en la solución del suelo. Para que el nitrógeno pueda ser absorbido por las raíces, el nitrógeno debe de estar en forma de nitrato (NO_3^-) o de amonio (NH_4^+), pero en la mayoría de las ocasiones

y debido a la acción de las bacterias nitrificantes hace que las plantas absorban el nitrógeno en forma de N-NO_3^- . En el caso del fósforo, su baja movilidad provoca que las raíces puedan absorberlo en su entorno como ion ortofosfato HPO_4^{2-} o H_2PO_4^- . Esta absorción se ve muy influenciada por el pH del suelo, predominando el ion H_2PO_4^- a pH alto. El potasio tercer y último macronutriente, es absorbido en forma de catión K^+ . La absorción de este nutriente por la planta frente al nitrógeno y el fósforo es menor.

En el caso de los diferentes micronutrientes estos son absorbidos dependiendo de diferentes factores; por ejemplo, el hierro se encuentra mayoritariamente, exceptuando en suelos muy ácidos, en forma de hidróxidos insolubles no asimilables por la planta. Las plantas han desarrollado dos estrategias distintas para tomar el hierro insoluble del suelo. Las plantas dicotiledóneas y las monocotiledóneas no gramíneas siguen la estrategia I (21), que se caracteriza por una acidificación del pH del suelo causada por la expulsión de protones por las células de la raíz, favoreciendo la solubilización del hierro férrico que es reducido a ferroso por enzimas situadas en la superficie radicular. Los iones ferrosos pueden ser entonces internalizados por la planta a través de transportadores específicos. Por otro lado, las gramíneas usan la estrategia II (27), que consiste en la secreción de fitosideróforos que se unen al hierro férrico formando complejos altamente estables que son introducidos a través de transportadores específicos. La aplicación de hierro a los suelos en forma de quelatos o complejos de Fe^{3+} , facilita enormemente la adquisición de hierro por las plantas, al serles este mucho más accesible independientemente de la estrategia que empleen (28).

El agua es el medio en el que los nutrientes del suelo se mueven hacia las raíces para su captación (29). El proceso básico de transporte de nutrientes consta de tres mecanismos: flujo de masa, difusión e intercepción por las raíces (30). La dinámica de este proceso para cada nutriente depende de la naturaleza del elemento en cuestión, de su forma química, de si está o no adsorbido sobre partículas minerales u orgánicas, de las condiciones del suelo (pH, por ejemplo), de la cantidad de agua disponible y de la concentración del nutriente en el suelo (31). El flujo de masa ocurre cuando los iones del nutriente son transportados por el flujo de agua hacia las raíces, ya sea por percolación, transpiración o evaporación. La difusión se genera por la presencia de gradientes de concentración entre la solución del suelo y las raíces (31). En cualquier caso, la captación de nutrientes tiene lugar al contactar la superficie de la raíz con la solución del suelo que contiene los minerales solubilizados.

Un ejemplo de transporte de nutrientes en un cultivo se encuentra en la Tabla 1, donde se muestran los datos de suministro de nutrientes en función de las diferentes dinámicas.

Tabla 1. Valores de cantidad de nutriente captado por la planta utilizando las diferentes dinámicas. Cultivo de maíz con un rendimiento de 9,5 tn ha⁻¹. Valores en kg ha⁻¹ para cada nutriente (32).

Nutriente	Cantidad absorbida	Intercepción directa	Flujo masal	Difusión
Nitrógeno	190	2	150	38
Fósforo	40	1	2	37
Potasio	195	4	35	156
Calcio	40	60	150	0
Magnesio	45	15	100	0
Azufre	22	1	65	0

Para determinar las cantidades y combinación de nutrientes a aportar en un proceso de fertilización, se requiere determinar el contenido de nutrientes del suelo, las necesidades específicas del cultivo y las características del sistema de producción, además de considerar las diferentes fuentes de nutrientes disponibles. A raíz del descubrimiento del proceso Haber-Bosch en los inicios del siglo XX, el cual permitió la síntesis de amoníaco a partir del nitrógeno del aire, agua y metano, se desarrollaron los procesos de fabricación de fertilizantes nitrogenados como la urea, las sales de nitrato y el sulfato de amonio (33). Ya entonces eran conocidos los procedimientos para producir fertilizantes químicos a base de fosfatos y de potasio, resultantes del tratamiento de rocas ricas en estos elementos con ácido. De esta manera, las necesidades de nitrógeno, fósforo y potasio en la agricultura se pudieron suplir con materiales sintetizados a nivel industrial.

De hecho, el empleo de grandes cantidades de fertilizantes químicos, junto a la introducción de otras novedades tecnológicas a partir de la Revolución Verde en los años 60 (plaguicidas, herbicidas, maquinaria, sistemas de irrigación, mejora genética de las especies cultivadas), ha permitido un enorme aumento de la productividad agrícola y de la seguridad alimentaria en el mundo en las últimas décadas. Sin embargo, este desarrollo ha tenido un considerable impacto negativo sobre el medio ambiente debido al agotamiento de los recursos naturales, a la ampliación de tierras cultivables y a la contaminación de los medios naturales asociada a la producción y al uso, en ocasiones, excesivo o inapropiado de fertilizantes y productos fitosanitarios.

Por lo anteriormente mencionado, hoy en día existe la necesidad de definir modelos de aplicación de fertilizantes para optimizar los rendimientos de los cultivos con el mínimo impacto sobre el medio ambiente. Entre los modelos establecidos actualmente a nivel global para realizar una fertilización agrícola sostenible se encuentran:

- Gestión sostenible del suelo.
- Gestión integrada de nutrientes.

- Manejo nutricional por sitio.
- Estrategia 4R.

Gestión sostenible del suelo

Este es un modelo orientado a los pequeños agricultores en el que se plantea la utilización eficiente de los recursos agua, suelo, animales y plantas para satisfacer las necesidades humanas de forma que se previene la degradación del suelo y recursos asociados, manteniendo su potencial productivo y funciones ambientales. Las prácticas propuestas para la gestión sostenible del suelo incluyen acciones para detener o revertir la degradación del mismo, mejorar la eficiencia en el uso de los recursos, conservar los recursos naturales, proteger los medios de vida rurales, reforzar la resiliencia de comunidades y ecosistemas, la implementación de mecanismos de gobernanza responsables y la minimización de los efectos negativos del mal uso previo. Un elemento fundamental en el enfoque es que se requiere un compromiso a largo plazo para mantener la calidad del suelo frente a presiones económicas cortoplacistas que promueven la utilización de tecnologías que explotan de manera no sostenible y degradan este recurso (34, 35).

Gestión integrada de nutrientes

La gestión integrada de nutrientes se orienta a mantener o ajustar la fertilidad del suelo mediante el suministro de una combinación apropiada de estos (a través de fertilizantes químicos, estiércol, residuos vegetales y otros) para lograr la productividad deseada, mantener la fertilidad del suelo y mejorar el beneficio económico del cultivo (36, 37).

En este modelo se propone que, para alcanzar la productividad idónea del cultivo, no solo se debe tener en cuenta el contenido en nutrientes del suelo, sino que deben considerarse otros factores agronómicos como el contenido de materia orgánica, pH, textura, profundidad y capacidad de retención de agua, ya que todos ellos influyen en la fertilidad y son diferentes en cada suelo (36, 38). La gestión integrada de nutrientes incorpora cuatro directrices principales:

1. Prácticas de conservación que permitan el uso de los nutrientes del suelo original.
2. Reciclaje de nutrientes orgánicos.
3. Uso de fuentes biológicas de nitrógeno.
4. El uso de fertilizantes inorgánicos únicamente en los suelos de baja fertilidad.

Asimismo, el modelo requiere considerar las interacciones entre factores edáficos, la fisiología del cultivo, factores climáticos, y factores socioeconómicos.

Manejo nutricional por sitio

En el modelo de manejo nutricional por sitio específico se calcula el rendimiento máximo esperado, se identifican las cantidades de nutrientes deficitarias en el suelo y, a partir de estudios agronómicos, se evalúa la efectividad del uso del fertilizante para determinar si las prácticas de fertilización son adecuadas o deben mejorarse (39). Este modelo establece un esquema de asesoría a nivel de parcelas y de microcuencas para optimizar el uso de los recursos locales dentro de su entorno económico más cercano, aprovechando, por ejemplo, las fuentes locales de nutrientes procedentes de la vegetación y la ganadería (40). El incremento de la productividad logrado con la nutrición específica del suelo y del cultivo permite maximizar la incorporación de los nutrientes y reducir la difusión de nutrientes en el ambiente (41). Para diferenciar este modelo frente al anterior (gestión integrada de nutrientes), la principal diferencia radica en la situación en la que queda el suelo después del cultivo. En el modelo anterior es importante que, después de la cosecha, el suelo mantenga una alta fertilidad, a diferencia del manejo nutricional por sitio, según el cual el estado del suelo será corregido en el siguiente ciclo de cultivo.

Estrategia 4R

La estrategia 4R se basa en utilizar el nutriente necesario, en la dosis, lugar y tiempo correctos. La selección del nutriente o nutrientes a aplicar, así como sus dosis, se lleva a cabo atendiendo a análisis fisicoquímicos de suelos y análisis nutricionales de las plantas, e implica monitorizar la extracción de nutrientes a través de experimentos de campo. El lugar de aplicación del fertilizante se elige con el objetivo de lograr un aprovechamiento óptimo por la planta, siendo este punto la principal diferencia frente al resto de los modelos, de modo que este se puede aplicar en el suelo directamente o a través del riego, para su absorción por las raíces, o vía foliar, para su penetración en la planta a través de las hojas. La aplicación del fertilizante en el momento apropiado del ciclo de cultivo permite incrementar la eficiencia en el aprovechamiento de los nutrientes y disminuir el impacto ambiental asociado a la fertilización (42).

En España se emplea el término de “Fertilización racional” para hacer referencia al modelo de fertilización en el que se combina la utilización de fertilizantes de origen mineral y de origen orgánico para obtener un

balance apropiado de nutrientes y así mantener o mejorar las características del suelo. Para cada uno de los cultivos principales, se proponen combinaciones particulares de fertilizantes, abonos y enmiendas orgánicas que permiten lograr rendimientos altos con el mínimo impacto sobre el ambiente. Entre las prácticas propuestas encontramos la producción integrada, la agricultura orgánica, la agricultura de conservación y la agricultura de precisión. En la producción integrada se diseña un programa de fertilización para cada cultivo, con aportes de fertilizantes naturales y aplicaciones mínimas de fertilizantes sintéticos. En la agricultura orgánica se emplean exclusivamente fertilizantes naturales, sin aportes de fertilizantes sintéticos. La agricultura de conservación plantea un esquema integrado del suelo y de los restantes recursos productivos, realizando prácticas agrícolas como la siembra directa, la mínima labranza y la utilización de coberturas vegetales. Por último, la agricultura de precisión implica el estudio de la variabilidad natural de los suelos dentro de una parcela o finca para establecer un programa específico para cada zona diferenciada, optimizando así los recursos productivos (3).

1.1.3.- SUSTANCIAS HÚMICAS Y FERTILIDAD DEL SUELO

Desde los primeros tiempos de la agricultura hasta hace relativamente pocas décadas, el único fertilizante disponible era la materia orgánica, en forma de estiércol o material vegetal procedente de restos de cosechas anteriores, que se dejaba en el suelo para que, con el tiempo, el carbono orgánico se incorporara a su estructura. Aunque los mecanismos técnicos involucrados no se han estudiado hasta hace relativamente poco tiempo, estas prácticas permitían retornar al suelo parte de la materia orgánica y a su vez nutrientes como el nitrógeno, potasio y fósforo (43).

La fertilidad de un suelo hace referencia a su capacidad para proporcionar a las plantas los nutrientes necesarios en las cantidades y proporciones adecuadas. Por otra parte, la productividad del suelo es una medida de lo que se obtiene en función de lo que se aporta al proceso agrícola.

La fertilidad y la productividad están íntimamente relacionadas. Los suelos de alta fertilidad se caracterizan por tener altos contenidos de materia orgánica, elevada disponibilidad de nutrientes y alta actividad biológica, lo que favorece el establecimiento y el crecimiento de las plantas (44, 45). Si el suelo no es fértil, los rendimientos serán bajos y la cosecha no tendrá la calidad requerida por los mercados. La fertilidad depende de factores asociados al suelo, mientras que la productividad incorpora los elementos económicos, es decir, está sujeta a factores económicos coyunturales como el precio de los insumos, del combustible de la maquinaria agrícola, del precio del producto agrícola en el mercado, etc.

Uno de los parámetros de productividad es el rendimiento de una cosecha por unidad de área, por ejemplo, kilos de grano o fruto por hectárea. Este rendimiento habitualmente está relacionado con la fertilidad del suelo. Un aporte de los fertilizantes químicos puede favorecer temporalmente un incremento del rendimiento de las cosechas, elevando la capacidad para producir cosechas en cantidad y calidad que permitan su comercialización rentable.

La fertilidad del suelo depende de sus características físicas, químicas y biológicas y de sus interacciones. Entre los atributos físicos de los suelos, se incluyen la textura, la estructura y erosionabilidad, la densidad aparente, la porosidad, la tasa de infiltración, la profundidad o la capacidad de retención de agua. Entre los factores químicos se engloban parámetros de pH, conductividad eléctrica, capacidad de intercambio catiónico, reservas de nutrientes o presencia de contaminantes. Finalmente, el componente biológico del suelo abarca conceptos como el de la materia orgánica, la biomasa microbiana, la presencia de lombrices de tierra o la respiración. Estas tres propiedades del suelo, individualmente y por interacciones entre sí, definen la calidad y funcionalidad del mismo para permitir el crecimiento y desarrollo óptimos de un cultivo (46). Como se ha comentara posteriormente, las sustancias húmicas, aunque al formar parte de la materia orgánica del suelo se clasifican dentro de sus propiedades biológicas, también tienen importantes efectos sobre los factores físicos y químicos (47). El carbono orgánico constituye la base de las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo y es la principal clave de su fertilidad a largo plazo. Normalmente, los suelos con alto contenido de carbono son más fértiles frente a los suelos áridos y sometidos a sobreexplotación que son menos fértiles (43).

El ciclo de la materia orgánica en el suelo (Figura 1), comienza por la degradación de la materia orgánica fresca, a través de dos procesos simultáneos que compiten entre sí: uno de **mineralización primaria**, con formación de compuestos inorgánicos (agua, CO₂, nitratos, fosfatos, sulfatos, etc.) y otro de **humificación**, mediante el cual se forman unas sustancias orgánicas complejas bioestables denominadas formalmente humus. A su vez, este humus también puede descomponerse a través de procesos de **mineralización secundaria**, dando lugar a compuestos inorgánicos; si bien, este proceso transcurre a una velocidad muy inferior a la mineralización primaria (3). El humus está compuesto por estructuras orgánicas más complejas que la materia orgánica original denominadas sustancias húmicas. Estas sustancias húmicas, en función de su peso molecular, el tipo y número de grupos funcionales que presentan y su solubilidad a diferentes pH's se clasifican en tres grandes grupos: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

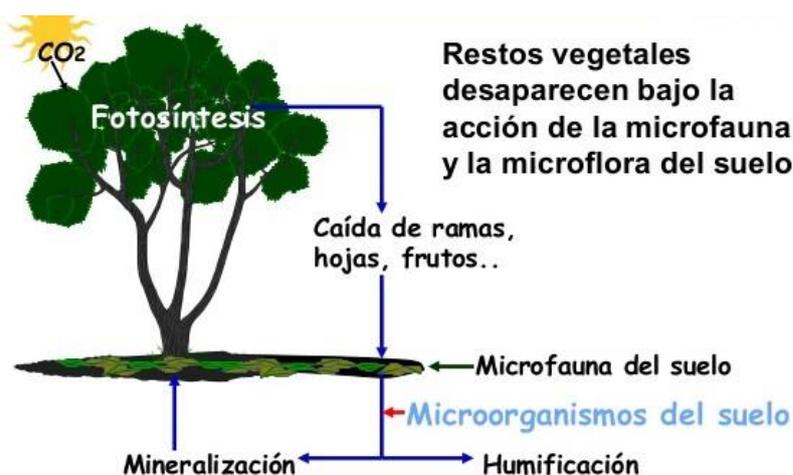


Figura 1. Ciclo de materia orgánica en el suelo

Los suelos con altos contenidos de materia orgánica tienen mayor capacidad de retención de agua, son más fáciles de labrar y son resistentes a la compactación (43). Se estima que, idealmente, un suelo fértil debe contener un 3,8% de materia orgánica. No obstante, la mayoría de suelos agrícolas del mundo contienen menos del 2%. Concretamente, en España, se ha determinado que la mayoría de los suelos contiene menos de 1,7% de materia orgánica (3). La fertilidad del suelo depende, en buena parte, del mantenimiento de un balance apropiado del humus. Los suelos más fértiles destruyen mucha materia orgánica, pero también generan mucho humus (3).

Por lo tanto, para mantener la fertilidad del suelo es importante establecer aportes de materia orgánica. Estos aportes pueden ser realizados mediante compost o estiércol. El compost es una fuente ideal de materia orgánica, debiendo considerarse la utilización de compost maduro para evitar pérdidas de nutrientes por la propia descomposición del material compostado y los riesgos de la presencia de bacterias o sustancias tóxicas. El estiércol es una fuente fácilmente disponible, pero su utilización requiere precauciones con la calidad biológica del material para evitar contaminación con agentes patógenos (43).

En el mundo de la agricultura son reconocidos los efectos positivos de la aplicación de sustancias húmicas sobre el crecimiento de las plantas o su tolerancia a estreses.

Las sustancias húmicas, constituyentes del humus, son el componente principal de la materia orgánica del suelo y tienen un papel esencial en la nutrición de las plantas. Aquellos suelos que contienen un nivel adecuado de estos materiales sufren menos estrés, son más saludables y, en consecuencia, las cosechas son más abundantes y los alimentos producidos a partir de estas tienen un mayor valor nutricional (48). Además, las sustancias húmicas pueden ejercer efectos directos e indirectos sobre el crecimiento de las plantas. De

hecho, numerosos estudios han demostrado que las sustancias húmicas tienen efectos positivos sobre el crecimiento y el rendimiento, a nivel cuantitativo y cualitativo, de multitud de cultivos de importancia agronómica como el olivo (49), la viña (50), la patata (51), el trigo (52), el arroz (53), la colza (54), el pepino (55), el tomate (56, 57, 58, 59), la fresa (60), la soja (61), la lima (62), hoja de palma (63), la soja (64), el arroz (65), la morera (66) o la fresa (67).

Esto es debido, entre otras cosas, a que mejoran la estructura del suelo y su fertilidad, promueven la absorción de nutrientes y el desarrollo de la arquitectura radicular (68, 69) y bloquean o inactivan sustancias tóxicas presentes en el suelo (48). Estas sustancias no solo tienen efectos positivos sobre el crecimiento de raíces y parte aérea de las plantas, sino que también estimulan la germinación de varias especies de cultivos (70) y mejorar la tolerancia a estrés abiótico (69).

En este sentido, las sustancias húmicas, además de mejorar la estructura del suelo, aumentan su capacidad de retención de agua, lo cual es fundamental para soportar las épocas de sequía. El efecto positivo sobre el estado de agregación del suelo conlleva que las partículas estén más sueltas, favoreciendo así la aireación y el flujo del agua hacia las raíces (71). Asimismo, las sustancias húmicas contribuyen a tamponar el pH del suelo y a reducir la salinidad en aquellos casos en los que se ha aplicado un exceso de fertilizantes químicos.

Otro de los principales efectos positivos atribuidos a la aplicación de sustancias húmicas en la agricultura es la capacidad de mejorar la disponibilidad de micronutrientes a partir de hidróxidos poco solubles (72), estando bien caracterizada su capacidad de mejorar la absorción de Fe (73, 74). Esto es debido a que en la estructura de las sustancias húmicas se encuentran grupos funcionales carboxílicos, hidroxilos fenólicos y otros grupos aromáticos y alifáticos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre, lo cual les permite formar complejos estables con metales, permitiendo que se mantengan en solución y en formas disponibles para las plantas en la mayoría de los suelos (75). Un ejemplo de las sustancias que son complejadas por las sustancias húmicas son los metales como el hierro o el cobre (76, 77). Por lo tanto, el empleo de sustancias húmicas también puede contribuir a la remediación de la contaminación con metales pesados y plaguicidas (78, 79).

Además de mejorar la disponibilidad de micronutrientes, se ha observado que los ácidos húmicos y fúlvicos potencian la absorción de macronutrientes como N, P, K, S, Ca y Mg, multiplicando así su efecto positivo sobre el metabolismo de las plantas (69, 80, 81, 82).

Buena parte de los efectos positivos de las sustancias húmicas se deben a la estimulación de determinados microorganismos beneficiosos para el crecimiento vegetal (83). No obstante, los mecanismos bioquímicos y moleculares subyacentes a dichos fenómenos se desconocen en su mayor parte ya que la gran variedad de

reacciones químicas y biológicas que dan lugar a las sustancias húmicas a partir de la descomposición de materia vegetal y microbiana hacen de ellas una mezcla de moléculas complejas y con diferentes propiedades (84).

La investigación sobre sustancias húmicas sigue siendo un área de gran interés en la agricultura. Actualmente, no es solo un tema de agronomía o ciencia del suelo, sino que es un área de trabajo multidisciplinario en el cual se combinan experiencias técnicas de diferentes especialidades, incluyendo también la biología molecular y celular, orientadas a obtener una mejor comprensión de los fenómenos involucrados (85).

Si bien, como se ha descrito con anterioridad, el aporte de sustancias húmicas como fuente de materia orgánica presenta grandes beneficios dotando al suelo de una mayor fertilidad, los efectos positivos de su aplicación en la agricultura no se limitan a este aspecto. Las sustancias húmicas tienen una gran capacidad de quelatación y complejación de metales, lo que les confiere unas cualidades idóneas para su aplicación tanto en el tratamiento de deficiencias de micronutrientes como en la remediación de suelos frente a su degradación y contaminación por el uso continuado de fertilizantes y pesticidas. Dada su relevancia en el campo agronómico y, en particular, en el trabajo desarrollado en esta tesis, se amplían más detalladamente estos aspectos en los siguientes subapartados.

1.1.4.- QUELATACIÓN Y COMPLEJACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS EN AGRICULTURA

Según AEFA (Asociación Española de Fabricantes de Agronutrientes) un quelato consiste en una especie química capaz de combinarse con un ion metálico a través de dos o más átomos dadores de electrones, formando una estructura, por lo general cíclica, que le brinda una gran estabilidad al conjunto. En cambio, un complejo se da cuando tan solo hay un átomo dador de electrones y la ubicación del metal no es simétrica (Figura 2). Al aplicar metales quelatados/complejados al suelo, estos se encuentran en formas disponibles para las plantas, de manera que estas pueden tomarlos y utilizarlos.

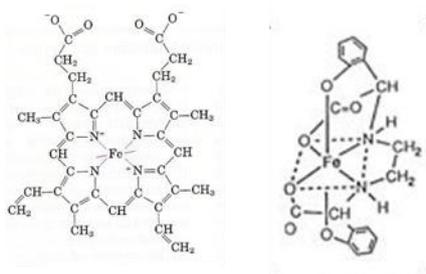


Figura 2. Izquierda: Estructura de un complejo coordinado con un Fe^{2+} . Derecha Fe^{3+} EDDHA

Los quelatos y complejos en función de su origen pueden clasificarse en naturales y sintéticos. Los complejos naturales incluyen lignosulfonatos, fenoles y poliflavonoides, obtenidos a partir del proceso de pulpa para papel, sustancias húmicas, ácidos orgánicos y aminoácidos. Por su parte, los quelatos sintéticos incluyen una familia de compuestos como el EDTA (ácido tetra acético de la etilendiamina) y el EDDHA (ácido etilendiamina dihidroxi fenil acético), que en agricultura se emplean generalmente como quelatos de hierro, ya que mantienen una alta disponibilidad de este metal en el suelo (86). Los agentes quelantes sintéticos son los más utilizados por su alta eficiencia, especialmente en cultivos de alto rendimiento (86, 87).

Los quelatos y complejos también se pueden clasificar como fuertes, intermedios o débiles en función de su poder quelatante y complejante. Por ejemplo, el EDTA se considera un quelato fuerte, los lignosulfonatos (ácidos fúlvicos) se consideran complejos intermedios y el ácido cítrico se considera débil. En función de la aplicación agronómica, conviene seleccionar el material idóneo a utilizar. Un agente quelante o complejante fuerte no es adecuado para la aplicación foliar pues presentan problemas para penetrar la pared celular (88, 89).

Por tanto, el uso en la agricultura de unos u otros quelatos y complejos viene condicionado por las necesidades del cultivo y la afinidad del agente y el metal. No obstante, también influye en su elección si el cultivo es ecológico, en cuyo caso el uso de sustancias sintéticas queda descartado o limitado.

1.1.4.1 Uso de sustancias húmicas en tratamiento de deficiencias de micronutrientes (Fe, Mn y Zn)

Los micronutrientes, aunque requeridos en menores cantidades que los macronutrientes, son esenciales para el crecimiento y desarrollo vegetal. Su presencia en el suelo es variable y su deficiencia, además de provocar la disminución del rendimiento y calidad de las cosechas, causa síntomas visibles de estrés fisiológico como el enanismo, la clorosis o la aparición de puntos necróticos en las hojas (90). La deficiencia de micronutrientes puede ser provocada por multitud de factores: pH del suelo, actividad microbiana, textura del suelo, cantidad de materia orgánica presente en el suelo, interacciones con diferentes compuestos, etc.

A nivel agrícola, los micronutrientes, cuando son aplicados en forma de sales de azufre o cloro, tienden a mostrar una baja solubilidad en el suelo por lo que la disponibilidad para las plantas suele ser reducida. En suelos con pH básico, se favorece la oxidación de los micronutrientes y estos tienden a formar complejos poco solubles con carbonatos e hidróxidos. Conforme aumenta la acidez del suelo, también lo suele hacer la disponibilidad de los micronutrientes (91, 92). No obstante, en suelos ácidos, metales como el hierro o el manganeso pueden disminuir la asimilación del fósforo, ya que precipitan con este elemento dando formas insolubles. Para el cinc, una carencia en la planta por el pH elevado del suelo y su precipitación en forma de hidróxido de cinc provocan en la planta una reducción del aprovechamiento del nitrógeno aportado, así como la capacidad de fijación del nitrógeno atmosférico.

La aplicación de metales en forma de quelatos evita su precipitación, permitiendo que los nutrientes se mantengan disponibles para ser absorbidos por la planta. Los quelatos metálicos pueden incluso ser aplicados en dosis mayores a las aplicadas en forma de sales sin observarse efectos fitotóxicos (90). Los complejos también pueden ser aplicados vía foliar con excelentes resultados al eliminar la competencia de las partículas del suelo por el nutriente (93).

El hierro es un nutriente esencial para las plantas puesto que los cofactores enzimáticos basados en hierro, tales como los complejos hierro-azufre, los grupos hemo y otros grupos prostéticos con hierro son necesarios para el ensamblaje funcional de numerosas proteínas (94). Así pues, los cofactores de hierro activan y dotan de una estructura adecuada a enzimas de gran relevancia en muchos de los procesos más importantes que tienen lugar en las células vegetales como la fotosíntesis o la respiración.

El hierro, a pesar de ser el cuarto metal en abundancia en la corteza terrestre (media en España de 3,8 %) (87), en numerosas situaciones no se encuentra en forma soluble y por tanto disponible para los cultivos. Dependiendo de las condiciones del suelo, en particular en suelos alcalinos, el hierro puede encontrarse en estados no solubles, provocando deficiencias para los cultivos y dando lugar a la clorosis férrica. La clorosis férrica es un síntoma de deficiencia de hierro en las plantas y se asocia a la baja solubilidad de los óxidos de hierro en los suelos calizos de pH alto (8-9). También, en aquellos suelos en los que existe una gran presencia de ion bicarbonato, la sensibilidad del cultivo para la asimilación del hierro disminuye. Además, los problemas de solubilización de hierro se ven agravados por condiciones como un riego excesivo, la presencia de nematodos, suelo frío, etc. Para lograr la adecuada disponibilidad del hierro, éste debe permanecer en forma soluble y para ello, es necesario incorporar al suelo productos que aseguren la permanencia del hierro en esta forma, tal y como ocurre con los quelatos y complejos de hierro (95). Para el tratamiento de las

deficiencias de hierro en los cultivos se han desarrollado con éxito múltiples tratamientos basados en la aplicación de hierro complejo/quelatado con sustancias húmicas (75, 96) y lignosulfonatos (95).

Los quelatos basados en lignosulfonato tienen una alta capacidad de combinarse y proteger el hierro y constituyen productos biodegradables, sin embargo, son poco estables en suelos alcalinos, por lo que generalmente se recomiendan para hidroponía o aplicación foliar. Quelatos férricos, en base a EDDHSA, han demostrado tener una buena estabilidad en pH mayor de 7, con estabilidades del orden de 90 % (86).

En el trabajo de Rodríguez-Lucena (97), se ha comparado la aplicación de lignosulfonatos de hierro con quelatos sintéticos en soluciones nutritivas de un cultivo hidropónico de soja, encontrando una mayor absorción de hierro en las plantas tratadas con quelatos sintéticos y coincidiendo con que la fracción de hierro quelatado es mayor en estos materiales. La absorción de hierro por las plantas tratadas con lignosulfonato fue muy lenta en comparación con las tratadas con quelatos sintéticos, pese a que los lignosulfonatos empleados contenían una fracción de hierro complejada considerablemente alta. Este estudio sugiere que la aplicación de complejos de hierro junto a aminoácidos es una alternativa para mejorar la eficiencia de su absorción (97), puesto que determinados aminoácidos pueden favorecer la toma de nutrientes minerales, además de complejar metales.

Otros estudios en hidroponía han demostrado la eficacia para la nutrición férrica de la aplicación de hierro complejo con sustancias húmicas (98, 99). Los tratamientos con ácidos fúlvicos muestran la capacidad de restaurar la permeabilidad radicular. Los tratamientos con ácidos húmicos, incluso en condiciones severas, presentaron resultados positivos en el contenido de hierro foliar y en el aumento de la masa aérea. Los resultados indican que las sustancias húmicas estudiadas actúan como fertilizantes férricos y su eficacia como tales depende de la solubilidad en el medio y de las condiciones experimentales, a diferencia de los quelatos sintéticos EDDHA que proporcionan solamente una mejor respuesta como agente quelante, sin influir en otros aspectos como puede ser la masa aérea, radicular, etc. La disponibilidad de micronutrientes depende tanto de la fuente como de las dosis aplicadas y son diferentes para cada nutriente en los distintos tipos de suelos (100).

Otro aspecto importante de la adición de sustancias húmicas como enmiendas al suelo es que la misma favorece la solubilización del hierro nativo no disponible del suelo a través de la formación de complejos o quelatos (101). Asimismo, un estudio que compara la eficacia de los agentes quelantes de hierro EDDHA y EDTA en pepino sugiere que la forma o-p-EDDHA-Fe⁺³ es el mejor sustrato para la reductasa de hierro, enzima presente en las raíces esencial para la absorción de este metal (102). Además, en este mismo trabajo, la

aplicación de EDDHA resultó en la solubilización de hierro nativo del suelo convirtiéndolo en disponible para la planta.

En cuanto al resto de microelementos metálicos esenciales para el desarrollo vegetativo de los cultivos, tales como el manganeso, el cinc y el cobre, estos se encuentran en los suelos en concentraciones mucho más bajas que el hierro (medias de España de Mn de 0,06%, de Zn 0,005% y de Cu 0,003%) (89), por lo que su disponibilidad es todavía menor provocando deficiencias que deben ser corregidas mediante una fertilización adecuada en formas asimilables por las plantas, siendo la solución más extendida, al igual que en el caso de hierro, la aplicación en forma de quelatos y complejos.

En la actualidad el micronutriente quelatado o complejado más consumido en el mundo es el hierro, pero esto no implica que la tendencia de los usos obligue a las industrias fertilizantes a desarrollar la misma tecnología para la aplicación del cinc y el manganeso utilizando sustancias húmicas, ya que en la coyuntura actual de maximizar los rendimientos en los cultivos con la carencia de algunos de estos metales origina una reducción en la producción y puede ser subsanado con el uso de las sustancias húmicas con diferentes micronutrientes. En este sentido, el uso de complejos a partir de sustancias húmicas requiere un trabajo de optimización en el proceso de fabricación para que estos puedan ser utilizados como fertilizantes complejados y, a su vez, supone una diferencia ventajosa en el uso de fertilizantes ecológicos.

1.1.4.2.- Uso de sustancias húmicas en remediación

Cuando el agua o el suelo resultan afectados por algún tipo de contaminante, sus propiedades pueden resultar alteradas. En consecuencia, los procesos de degradación del suelo y del agua impactan tanto en la disponibilidad de alimentos como en la calidad de los recursos ambientales y pone en riesgo la viabilidad de las explotaciones agrícolas a medio y largo plazo. Por este motivo, la conservación de los suelos agrícolas requiere reducir o revertir los procesos de degradación. Las técnicas utilizadas para estos procesos se conocen colectivamente como técnicas de remediación y descontaminación. La selección de las tecnologías apropiadas depende de una serie de factores, como el tipo de recurso afectado y la magnitud de la afectación. Las tecnologías a utilizar deben considerar las medidas para el tratamiento, contención, eliminación y manejo de las sustancias químicas o desechos, de tal forma que no presenten riesgos adicionales para la salud o el ambiente, considerando tanto el uso actual como el uso potencial del sitio (103).

Dentro de estas tecnologías de remediación, una de las alternativas más innovadoras es la utilización de sustancias húmicas aprovechando su capacidad para la complejación de metales. La reactividad de las sustancias húmicas les permite interactuar con distintas clases de sustancias tóxicas formando complejos con

metales pesados y radionúclidos, produciendo aductos y complejos de transferencia de carga con compuestos orgánicos hidrofóbicos, interviniendo en reacciones redox con metales de transición y reaccionando con compuestos clorinados y nitrados. Numerosos estudios han demostrado su viabilidad y eficacia en procesos de biorremediación, fitorremediación y, en general, para la descontaminación y recuperación de suelos provocados por la presencia de metales pesados en suelos y agua de riego, salinización de suelos, utilización intensiva de productos fitosanitarios (herbicidas, fungicidas e insecticidas), presencia de hidrocarburos aromáticos, etc. (104). A continuación, se lleva a cabo una revisión de estos trabajos centrados en la utilización de sustancias húmicas para la recuperación de suelos contaminados.

Eliminación de metales pesados en suelo

Los metales pesados son elementos químicos naturales con pesos atómicos y densidades relativamente altas. Algunos de ellos, como el hierro, el manganeso, el cinc, el cobalto, el arsénico, el vanadio, el cobre, el níquel y molibdeno, son esenciales para los organismos vivos, pero se vuelven tóxicos en niveles elevados de concentración. Otros, como el cadmio, el mercurio y el plomo, no tienen una función conocida en los organismos y son altamente tóxicos incluso en bajas concentraciones (105).

En el trabajo de Burlakovs (106) se llevó a cabo un estudio del tratamiento con ácidos húmicos, obtenidos a partir de turba, de suelos contaminados artificialmente con soluciones de cobre y plomo, evaluando durante un periodo de 4 meses la disponibilidad biológica de estos metales. Como resultado principal del estudio se obtuvo que las fracciones estables de cobre y plomo aumentaron respectivamente de un 42 % a un 80 % y de un 63 % a un 81 %. El estudio concluye que la adición de sustancias húmicas incrementa la formación de complejos estables de cobre y plomo, haciéndolos menos disponibles para las plantas.

En otro estudio, Klulakova et al. (107) investigaron la utilización de ácidos húmicos derivados de lignito como absorbente de metales pesados. Como resultados principales del estudio, para el caso del cobre y del plomo se encontraron eficiencias de extracción altas, entre el 80 y el 100 %, quedando ambos metales fuertemente enlazados en los complejos húmicos, y siendo su lixiviado muy bajo. En cuanto a las concentraciones de cadmio y cinc en las fases móvil e intercambiable fueron bajas en comparación con la concentración de cobre, sin exceder el 40 % del contenido total. El estudio concluye que los ácidos húmicos de lignito son adecuados como absorbentes de metales pesados y pueden ser empleados para la limpieza de aguas, suelos y otros sistemas con concentraciones bajas de iones metálicos. Las recuperaciones bajas pueden compensarse con la adición de ácidos húmicos frescos para eliminar la posibilidad de contaminación cruzada del sistema.

Finalmente, en el trabajo de Rajkumar et al. (108) estudiaron la formación de complejos de cobre, cadmio y plomo como iones divalentes con ácidos húmicos extraídos de tres fuentes diferentes, determinando las constantes de estabilidad y considerando la influencia del pH y la fuerza iónica del medio de reacción. La estabilidad de los complejos siguió el orden cobre>plomo>cadmio para los ácidos húmicos de cualquier fuente, aumentando con el pH y la fuerza iónica del medio. Los ácidos húmicos derivados de sedimentos mostraron una mayor fuerza complejante que los obtenidos de lodos de depuradora.

Con estos estudios se demuestra que los ácidos húmicos son utilizados con resultados satisfactorios para la protección y regeneración del suelo mediante la complejación de metales pesados. Esta cualidad permite utilizar los ácidos húmicos en situaciones críticas de contaminación de suelos con metales pesados, siendo a día de hoy la solución más sencilla y factible.

Eliminación de metales pesados en aguas

En el trabajo de Arslan (109) se investigó la eliminación de cobre (II) y níquel (II) de soluciones acuosas usando ácidos húmicos obtenidos de lignito en un proceso discontinuo. Se evaluó el efecto de la concentración inicial del metal, el pH y la temperatura sobre la eliminación del metal, obteniéndose rendimientos del orden de 80 % para cobre (II) y 82 % para níquel (II) y concluyendo que la absorción de los metales aumenta con el pH (máxima a 4.1) y la concentración inicial. El aumento de la temperatura causa un ligero descenso en la absorción.

En otro estudio sobre remediación de aguas residuales Kochany et al. (110) se demostró que los humatos comerciales pueden ser utilizados para remediación de fenol, formaldehído, aceite mineral, fósforo y metales pesados (cobre, hierro y manganeso). La eliminación es mayor en la aplicación de extractos húmicos en comparación con un tratamiento químico. Se encontraron tasas de eliminación del 41,8 % para compuestos de nitrógeno y del 99,2 % para fenol.

Salinización de suelos

La salinización de los suelos está considerada como uno de los problemas más graves que enfrenta la agricultura. Es un proceso de degradación definido como acumulación de exceso de sales en la zona radicular, que genera una pérdida parcial o total de la productividad del suelo con eventual desaparición de la vegetación. Los problemas de salinidad ocurren en todos los continentes y condiciones climáticas, aunque

son más notables en zonas áridas o semiáridas y regiones costeras. Se estima que entre un 7 % y un 10 % de los suelos están afectados por este problema (111,112, 113, 114).

Un estudio del efecto de la aplicación de sustancias húmicas comerciales de diferente origen (lignito, residuos vegetales y turba) a plantas de tomate cultivadas bajo condiciones de estrés salino mostró mejoras significativas en la germinación, en las etapas de crecimiento y en los rendimientos y calidad de los frutos (112). Dichas mejoras se deben principalmente al incremento de la capacidad de intercambio catiónico que aportan las sustancias húmicas, así como a la reducción de la salinidad o la sodicidad en el suelo. Los mejores resultados globales se obtuvieron con las sustancias húmicas de turba.

Contaminación de suelos por el uso de fitosanitarios

Para la protección de los cultivos se utilizan una serie de productos químicos, que en conjunto se denominan fitosanitarios e incluyen herbicidas, fungicidas e insecticidas. Gran parte de los fitosanitarios que se aplican, aunque sea de forma foliar, llega a los suelos, pudiendo acumularse o sufrir procesos de volatilización, lavado, degradación, o transformación en otros productos, contaminando gravemente tanto el suelo como el agua e incluso pudiendo incorporarse a la cadena alimentaria humana (111).

A los ácidos húmicos también se les atribuye la capacidad de inactivar determinados tipos de pesticidas. En el trabajo de Cwiela-Piaseka (115), se comparó el comportamiento de un ácido húmico de origen edáfico con un biochar de trigo en cuanto a su capacidad de absorción de cinco pesticidas polares (2,4-D, MCPA, metolachlor, carbofuran y carbaryl) en condiciones de laboratorio. Se encontró que los ácidos húmicos muestran una mayor afinidad por los pesticidas iónicos (2,4-D, MCPA y metolachlor) mientras que el biochar muestra afinidad por el carbofuran, el carbaryl y el metolachlor. El mecanismo de absorción de pesticidas por los ácidos húmicos se basa en la interacción con sus grupos funcionales, mientras que en el caso del biochar de trigo se relaciona con enlaces hidrofóbicos. El pH ejerce un efecto importante en el control de los procesos de absorción y desorción. Los resultados muestran un nivel de selectividad de los ácidos húmicos que puede ser de interés en el desarrollo de métodos de remediación de suelos contaminados con pesticidas iónicos, mientras que el biocarbono de trigo puede utilizarse para pesticidas no iónicos.

Remediación de suelos relacionados con la actividad minera

La actividad minera, en especial la realizada en operaciones a cielo abierto, tiene un gran impacto sobre el suelo. Se remueven capas del suelo con maquinarias y se almacenan durante varios años para su posterior aplicación en la rehabilitación del terreno. Esto destruye la estructura y modifica la textura del suelo debido a una reducción de las fracciones de arcilla. Asimismo, se alteran los ciclos biogeoquímicos, reduciendo la capacidad de intercambio y la retención de agua (116). Los ácidos húmicos han sido empleados para generar bioacondicionadores de suelos provenientes de minas de carbón, consiguiendo mejorar significativamente las propiedades químicas y biológicas del suelo, así como la absorción de nutrientes por el cultivo crecido en dicho suelo (117).

Los resultados del estudio de Vargas (118) indican que, en suelos con bajos contenidos en metales, al aplicar sustancias húmicas se aumenta la movilidad de los mismos, mientras que, en suelos contaminados, se produce su inmovilización. La aplicación de sustancias húmicas mejoró el crecimiento de las plantas crecidas en ambos tipos de suelos.

Eliminación de contaminantes orgánicos

Las diversas familias constituyentes de los hidrocarburos alifáticos y aromáticos están presentes en casi todos los ambientes del planeta (119) siendo los contaminantes orgánicos más frecuentes que se pueden encontrar en suelos y aguas.

En general, la degradación de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) en suelos envejecidos es muy reducida, ya que estas macromoléculas presentan una alta hidrofobicidad lo que reduce su biodisponibilidad y limita la remediación. En un estudio acerca del efecto de las sustancias húmicas sobre los HAP en reactores de lodo, Fava et al. (120) observaron que la utilización de compuestos tensoactivos naturales basados en sustancias húmicas, intensifica la biorremediación aeróbica en condiciones similares a las empleadas a gran escala para biorremediación.

Otro ejemplo de la utilización de ácidos húmicos para la eliminación de contaminantes orgánicos fue investigado en el trabajo de Yahun (121) para el tratamiento de derrames en oleoductos. En dicho estudio se evaluó un tratamiento de remediación mediante barreras reactivas utilizando ácidos húmicos para filtrar el suelo y las aguas subterráneas debido a la variedad de agentes contaminantes presentes en los derrames petroleros, incluyendo benceno, tolueno, metilbenceno, xilenos e hidrocarburos poliaromáticos y metales

pesados, como cromo, plomo y arsénico. El método planteado mostró ser una opción efectiva para la remediación en un rango amplio de pH, con y sin luz solar directa.

Otros trabajos en la misma línea de investigación fueron los realizados por Abdul et al. (122) e Interiano et al. (123). En el primero, determinaron que la adición de sustancias húmicas a un material arenoso mejora notablemente la eliminación de hidrocarburos aromáticos relativamente poco solubles como p-xileno, etiltolueno, sec-butil benceno y tetra metilbenceno, logrando retenciones del 1.4 %, 6.4 %, 39 % y 43 %, respectivamente. En el segundo, se utilizaron biopilas de ácidos húmicos y consorcios microbianos para el tratamiento de mezclas de recortes de perforaciones petroleras, llegando a eliminar hasta el 72 % de los hidrocarburos totales.

Finalmente, también se han llevado a cabo estudios sobre la biorremediación de aguas residuales que contienen niveles elevados de formaldehído y fenol, lo que produce un efecto de inhibición del proceso por la acción microbiana. En el trabajo de Lipcynska-Kochany (124) se muestra como la adición de ácidos húmicos reduce notablemente este efecto inhibitorio, constituyendo una alternativa frente al carbono activado o absorbentes especializados. Otro ejemplo de aplicación de sustancias húmicas para el tratamiento de aguas residuales, lo constituye el trabajo de Kochany et al. (110), en el cual utilizaron humatos, demostrando que estos promueven la detoxificación de compuestos orgánicos e inorgánicos inhibitorios de procesos biológicos. Los ácidos húmicos tienen la capacidad de aumentar la biodegradación de fenoles, formaldehído y aceite mineral e inmovilizar cobre, hierro y manganeso, lo que permite su utilización como relleno en barreras de contención en suelos.

1.2.- ORIGEN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS.

Como ya se ha indicado, la materia orgánica contribuye al crecimiento de las plantas a través de su efecto sobre las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. Los microorganismos (bacterias y hongos) tienen un papel central en la regulación de las transformaciones de la materia orgánica y de los nutrientes vegetales en los suelos. Algunos de los procesos edáficos más relevantes en los que intervienen los microorganismos presentes en el suelo son:

- a) la descomposición de los residuos vegetales y animales;
- b) la formación de las sustancias húmicas;

- c) la mineralización de la materia orgánica, que permite la liberación de los nutrientes que contiene esta;
- d) la fijación del nitrógeno y carbono;
- e) la formación de micorrizas;
- f) el control de patógenos vegetales; y
- g) la mejora de las propiedades del suelo (125, 126).

En el proceso de transformación de la materia orgánica en el suelo coexisten dos mecanismos, mineralización y humificación, cuyo equilibrio depende fuertemente de las características del suelo y de la naturaleza y composición de los restos orgánicos (127). El primero libera compuestos inorgánicos que contribuyen directamente a la nutrición vegetal y el segundo da lugar a la formación del humus a partir de compuestos orgánicos sencillos. La mineralización representa una simplificación de las estructuras, mientras que la humificación establece un aumento en la complejidad de los productos de la descomposición de la materia orgánica. La descomposición de la materia orgánica se produce a diferentes velocidades en función de la naturaleza de los compuestos que la integran, siendo más rápida para los azúcares, almidones y proteínas, más lenta para celulosa, grasas, ceras y resinas, y muy lenta para la lignina (128).

La figura 3 muestra un esquema que integra las diferentes vías de formación de las sustancias húmicas y los procesos de mineralización.

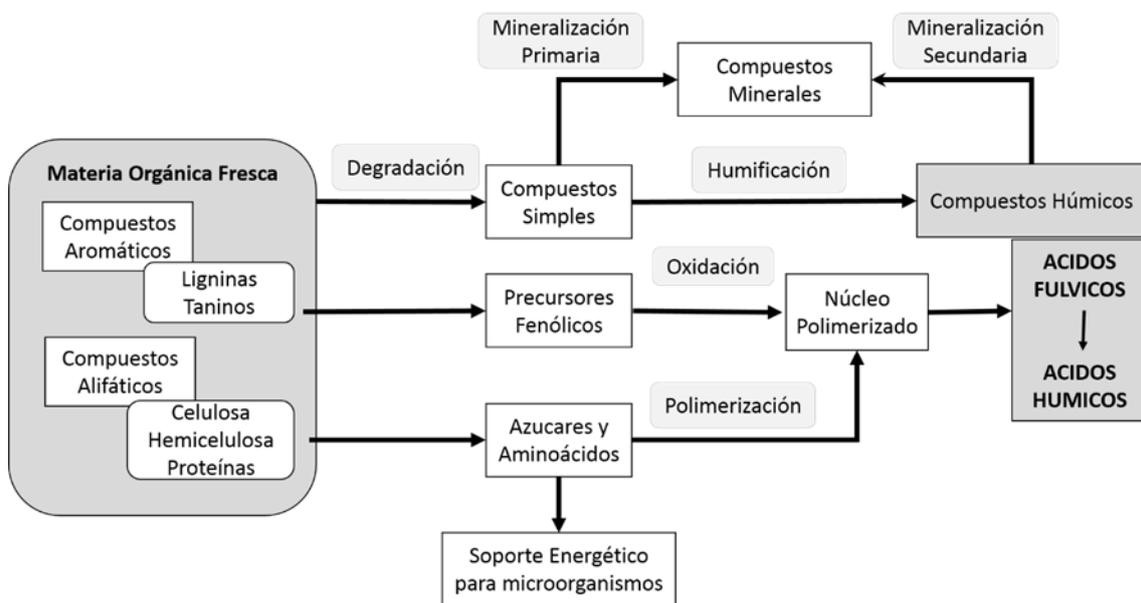


Figura 3. Formación de las sustancias húmicas (88).

De acuerdo a este esquema, la materia vegetal fresca está formada por una serie de compuestos orgánicos, tanto alifáticos como aromáticos, de diferente peso molecular con predominio de macromoléculas. Se encuentran lignina, taninos, celulosa, hemicelulosa, azúcares, proteínas, ácidos grasos, ceras, alcoholes, ésteres, ácidos y otros compuestos, todos ellos con un rol esencial en los procesos bioquímicos de las plantas. Las macromoléculas (celulosa, almidón, proteínas, polisacáridos) se degradan formando compuestos simples por la acción de enzimas y metabolitos liberados por microorganismos o por las raíces de las plantas. Una parte de las macromoléculas se mineraliza rápidamente y otra entra en el proceso de humificación. La celulosa y la hemicelulosa se degradan formando azúcares, como glucosa y sacarosa mientras que las proteínas originan aminoácidos. Parte de estos compuestos sirve como fuente de energía a los microorganismos del suelo, mientras que otra fracción se integra en el núcleo polimerizado y se incorpora al proceso de formación de las sustancias húmicas (126). La degradación de la lignina por acción de hongos y bacterias produce compuestos aromáticos, esencialmente de tipo fenólico, que por oxidación forman quinonas que se integran al núcleo polimerizado y finalmente originan sustancias húmicas.

Mineralización

La mineralización es el proceso mediante el cual un compuesto orgánico se degrada a sus componentes minerales, liberándolos en una forma química que es asimilable por las plantas. Se distinguen dos procesos de mineralización. Una mineralización rápida o primaria, en la que, a través de la acción microbiana, los elementos químicos presentes en la materia orgánica se liberan en forma de compuestos inorgánicos. Una parte de estos se integra en los minerales del suelo y otra se incorpora a la solución del suelo, donde se mantiene disponible para las plantas (127, 129). Por otro lado, existe una mineralización más lenta, o secundaria, a partir de compuestos húmicos provenientes de la degradación de la materia orgánica.

Los ciclos del carbono, nitrógeno, fósforo y azufre incluyen fases de mineralización, las cuales son esenciales para la composición química, física y biológica de los suelos, así como para la nutrición de las plantas.

En el ciclo del carbono, el CO₂ atmosférico, a través de la fotosíntesis, se incorpora a los tejidos vegetales. Cuando los residuos vegetales llegan al suelo, estos se degradan e integran en el mismo. La respiración de los microorganismos heterótrofos del suelo provoca la liberación de CO₂ y la mineralización de nutrientes a

partir de la materia orgánica (130, 131). Asimismo, la materia orgánica soluble, como consecuencia de procesos de lixiviación y erosión, llega a los ríos y océanos, incorporándose a la materia orgánica disuelta.

En el caso del nitrógeno, este elemento tiene tres vías principales de entrada a los suelos agrícolas: la fertilización mineral, la fijación biológica de nitrógeno atmosférico y a través de residuos orgánicos. La fijación biológica de nitrógeno tiene lugar por la presencia de bacterias diazótrofes, capaces de fijar el nitrógeno molecular y convertirlo en amonio (NH_4^+). En cambio, cuando este elemento entra en el suelo en formas orgánicas, como los aminoácidos, las bases nitrogenadas o las vitaminas, es transformado mediante una mineralización hasta llegar a NH_4^+ . El NH_4^+ es convertido en nitrito (NO_2^-) y posteriormente en nitrato (NO_3^-) por las bacterias nitrificantes del suelo. Aunque el amonio y el nitrato pueden ser absorbidos por las plantas, parte del amonio se pierde por su conversión a amoníaco y posterior volatilización y parte de los nitratos se pierden por lixiviación. Asimismo, en condiciones de anoxia, como las que se dan en suelos inundados o compactados, es habitual que se den procesos de desnitrificación, por los cuales el NO_3^- es reducido por determinados microorganismos del suelo y transformado en óxido nítrico, óxido nitroso y nitrógeno molecular (46, 132, 133).

El fósforo está presente en el suelo como fósforo orgánico e inorgánico. Sólo es asimilable el fósforo que se encuentra en la solución del suelo como iones di-orto-fosfato (HPO_4^{2-}) y mono-orto-fosfato (H_2PO_4^-). El fósforo orgánico proviene del estiércol de animales y de los residuos vegetales y microbianos. Una parte se mineraliza bajo la acción de enzimas fosfatasas y se incorpora a la solución del suelo, mientras que otra parte se incorpora a las sustancias húmicas donde se estabiliza. El fósforo inorgánico proviene de los minerales del suelo que lo contienen, como la apatita, que al sufrir un proceso de meteorización se disuelven permitiendo que el fósforo se incorpore a la solución del suelo. A partir de ésta, el fósforo puede adsorberse a la superficie de minerales como las arcillas y óxidos de hierro o aluminio o precipitar como compuestos secundarios de calcio, hierro, aluminio o magnesio. En función del pH del suelo, se produce la desorción o la disolución del fósforo, manteniendo un equilibrio con la solución del suelo (129, 133, 134).

La mineralización del azufre está gobernada por la disponibilidad de este elemento en el suelo y las necesidades de la flora microbiana. El azufre se transforma por dos mecanismos: la movilización y la mineralización. La movilización ocurre por acción de enzimas que atacan las moléculas grandes, tipo ésteres que se convierten en sulfatos, los cuales se liberan posteriormente por hidrólisis. Cuando la disponibilidad del azufre es superior a las necesidades microbianas, este se mineraliza, generando H_2S , que es volátil y escapa a la atmósfera, o generando sulfatos que se incorporan a la solución del suelo (135).

El potasio no está presente entre los elementos que se mineralizan pues no está incorporado en los compuestos orgánicos. Su principal fuente es la meteorización de los minerales que lo contienen, principalmente feldspatos (97) y micas, a partir de los cuales se incorpora a la solución del suelo (136, 137).

Humificación

En el proceso de humificación (Figura 3) se identifican tres fases. La primera consiste en la fragmentación de las macromoléculas por despolimerización enzimática. Posteriormente, los compuestos aromáticos se oxidan formando quinonas. Finalmente se produce la condensación y polimerización de los distintos compuestos que se reorganizan, manteniendo su estructura y formando polímeros más estables. Algunos factores, como la ausencia de agua o exceso por encharcamiento permanente, temperaturas bajas, acidez, carencia de nitrógeno, etc., ralentizan la transformación de los restos orgánicos por humificación. También la presencia de sustancias inhibitorias de la actividad microbiana, como es el caso de determinados taninos, fenoles y ácidos orgánicos, puede reducir la velocidad de transformación de los restos orgánicos (86, 138).

Las sustancias húmicas sufren asimismo el proceso de mineralización, conocido como mineralización secundaria, pero este es mucho más lento que el de la materia orgánica, debido a la estabilidad de los materiales que las forman.

El extracto húmico conforma junto a las láminas de arcilla el complejo arcillo-húmico, el cual es esencial para las propiedades físicas y químicas del suelo. En relación a las primeras, el complejo arcillo-húmico configura la estructura porosa del suelo, determinando su capacidad de aireación y de retención de agua y permitiendo un correcto desarrollo radicular de las plantas. Este complejo, además, dota al suelo de capacidad de intercambio catiónico, aspecto clave para su fertilidad. No obstante, el extracto húmico del suelo también sirve de sustrato para que los microorganismos aerobios que contiene lo consuman, obteniendo así energía y mineralizando nutrientes como el nitrógeno, el fósforo o el azufre (139, 140).

Las sustancias húmicas obtenidas en el proceso de humificación o mediante procesos de extracción son un conjunto de polímeros de alto peso molecular relacionados entre sí, que atendiendo a su peso molecular, el tipo y número de grupos funcionales (carboxilo, fenol, etc.), el grado de condensación y sus solubilidad frente a disoluciones acuosas de distinto pH, se establece una clasificación de las sustancias húmicas, tal y como se muestra en la Figura 4, en tres grupos principales: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

Sustancias húmicas

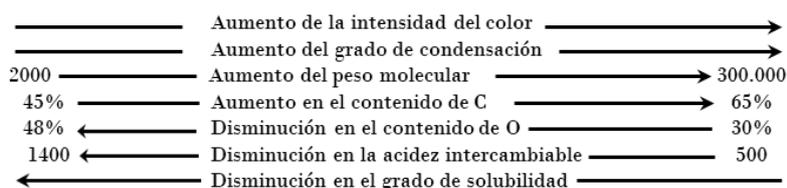


Figura 4. Propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas (141).

Ácidos fúlvicos (AF): dentro de las sustancias húmicas, corresponden con la fracción que presenta un menor peso molecular y un menor contenido en carbono. Además, presentan un bajo grado de condensación y son solubles en soluciones acuosas a cualquier valor de pH. En función de la solubilidad en medio ácido pueden diferenciarse dos fracciones distinguibles en base a su coloración. Aquellas fracciones formadas por cadenas más largas de carbono son solubles a pH ácidos más cercanos al valor neutro y presentan un color amarillo-amarronado, mientras que las fracciones correspondientes a cadenas más cortas son solubles a pH bajos y presentan un color más amarillo.

Ácidos húmicos (AH): corresponden con la fracción de las sustancias húmicas que presentan un mayor peso molecular, un mayor contenido en carbono y un mayor grado de condensación que los ácidos fúlvicos. Además, esta fracción no es soluble en soluciones acuosas ácidas ($\text{pH} < 2$), pero sí es soluble a pH altos (soluciones básicas). Esta característica constituye la base de los principales métodos de extracción para la separación de los ácidos húmicos y fúlvicos, ya que solo los segundos son solubles en medio ácido. Dentro de los ácidos fúlvicos se distinguen dos fracciones diferenciadas por su solubilidad en presencia de calcio. Aquellas que son solubles en su presencia se denominan ácidos húmicos pardos presentando un color marrón oscuro mientras que aquellas que no los son se denominan ácidos húmicos grises y presentan una coloración gris oscura.

Huminas: corresponden con la fracción de las sustancias húmicas que presentan los mayores pesos moleculares, contenido en carbono y grado de condensación, siendo, además, insolubles en soluciones acuosas para cualquier valor de pH. En cuanto a su coloración, presentan un color negruzco. A diferencia de las fracciones húmicas anteriores, las huminas no tienen ningún valor añadido como fertilizante ya que no son extraíbles por ningún tipo de solvente y no pueden ser absorbidas por la planta.

1.3.- MÉTODOS DE EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS

Las sustancias húmicas están presentes en suelo, turba, compost, carbones de bajo rango y aguas. La formación de estas sustancias húmicas tiene lugar de forma natural mediante procesos de humificación tal y como se ha descrito en el apartado 1.2. Este proceso natural no requiere la adición de sustancias químicas ni de procesos físicos externos para su obtención. Sin embargo, el tiempo de reacción para dar lugar a las sustancias húmicas en un proceso natural es elevado. Por este motivo se han desarrollado diferentes métodos de extracción industriales para incrementar tanto su concentración como su velocidad de obtención. Estos aspectos resultan de gran importancia para la producción industrial de fertilizantes basados en sustancias húmicas ya que permiten reducir los tiempos de producción y obtener rendimientos de extracción superiores al 70 %.

Existen cuatro procedimientos principales para la separación y fraccionamiento de las sustancias húmicas: extracción alcalina, extracción con solventes, extracción con resinas de intercambio y métodos mixtos. A su vez, dentro de cada método existen distintas variantes particulares, dependiendo tanto de las condiciones específicas en que se desarrolla cada proceso como del tipo de material al cual se aplica.

La comparación entre los distintos métodos de extracción se lleva a cabo tomando como valor de referencia el porcentaje de extracción o rendimiento de extracción. Este valor representa el contenido de extractos húmicos en la muestra tratada frente al contenido total de masa de la muestra expresado de forma porcentual. En el Capítulo 2 de este trabajo, se describen detalladamente los cálculos relativos a los rendimientos de extracción. A continuación, se describen las características principales correspondientes a cada uno de los diferentes métodos.

1.3.1.- EXTRACCIÓN ALCALINA

Este método, originalmente utilizado por Archard en 1786, es la base de muchos esquemas de separación y fraccionamiento. La diferencia en la solubilidad frente a ácidos y bases permite separar las sustancias húmicas en tres fracciones: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

El esquema básico de separación, conocido como el **método de Oden** (142), se muestra en la figura 5.

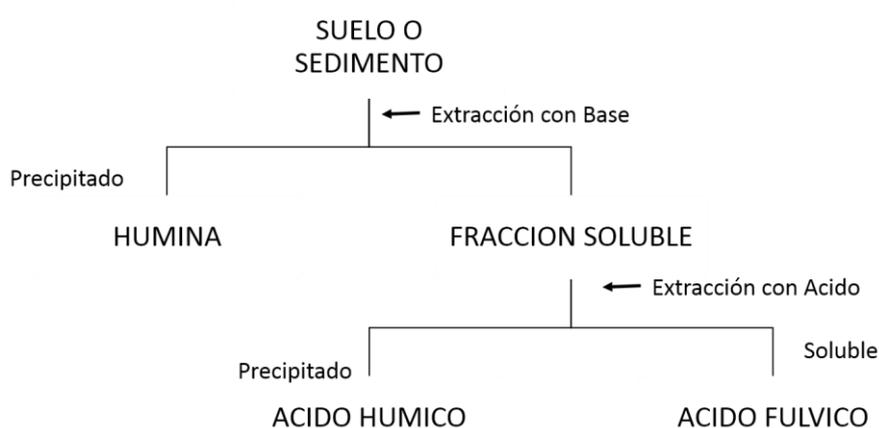


Figura 5. Fraccionamiento de sustancias húmicas bajo el esquema alcalino de Oden.

La muestra de suelo se prepara mediante secado, trituración y cribado. Al tratar la muestra con NaOH se obtiene un precipitado y una fracción soluble. El precipitado contiene la fracción de huminas, mientras que la fracción soluble contiene las sales sódicas de los ácidos húmicos y fúlvicos presentes. Al acidificar esta solución, precipitan los ácidos húmicos y se mantienen en solución los ácidos fúlvicos y otras moléculas de bajo peso molecular.

El rendimiento de la extracción de las sustancias húmicas puede verse afectado por una serie de factores entre los que deben considerarse el tamaño de partícula, el tipo y concentración de agente extractante, la relación muestra-extractante, la temperatura, el tiempo de contacto y la frecuencia de extracción (143). En el apartado A de los Anexos se ofrece una descripción más detallada del procedimiento completo.

Este método ha sido utilizado desde 1919 demostrando su utilidad. No obstante, a lo largo del tiempo se han planteado una serie de modificaciones al método alcalino original orientadas a obtener una mejor separación

de las diferentes fracciones. Un procedimiento de fraccionamiento de las sustancias húmicas que ha tenido un notable éxito es el propuesto por Stevenson en 1994, el cual se muestra en la figura 6.

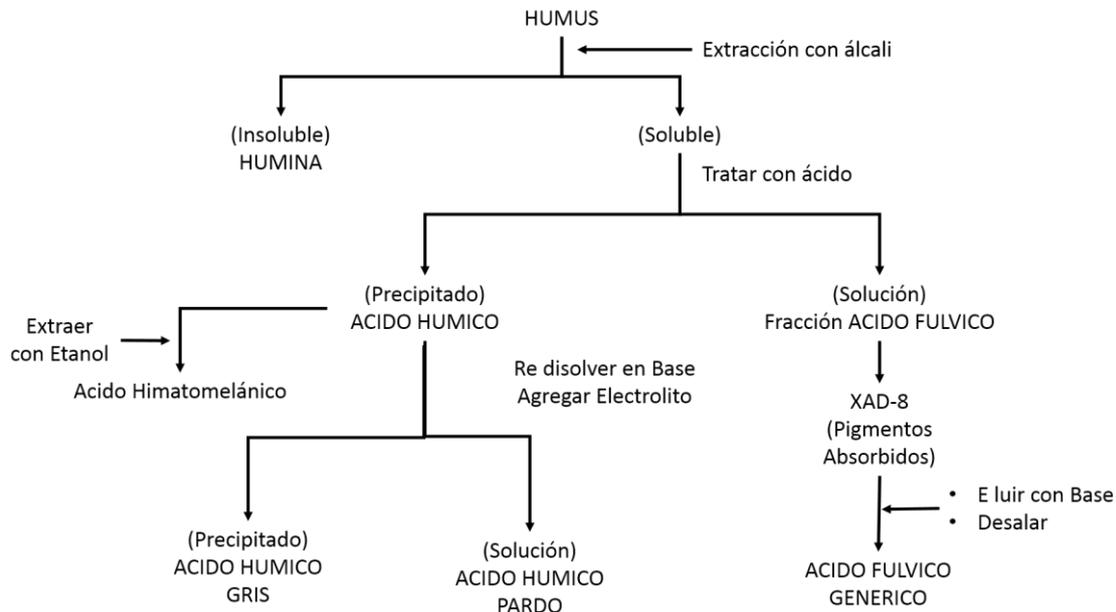


Figura 6. Fraccionamiento del humus del suelo según el método de Stevenson (104).

Las aportaciones de Stevenson consisten en la utilización de una resina hidrofóbica para separar la fracción de ácidos fúlvicos de otros materiales de bajo peso molecular, la separación del ácido himatomelánico de los ácidos húmicos y la posterior separación de los ácidos húmicos en dos fracciones diferentes.

En el **método de Stevenson**, las dos primeras etapas son idénticas al método alcalino clásico y las fracciones obtenidas del tratamiento con ácido reciben un tratamiento adicional. El precipitado, que contiene los ácidos húmicos, se extrae con etanol permitiendo la separación de una fracción conocida como ácido himatomelánico. El precipitado obtenido se vuelve a disolver en base y se agrega un electrolito para mejorar la separación. Como resultado se obtienen dos fracciones, conocidas como ácido húmico gris, que precipita, y ácido húmico pardo, que se mantiene en solución. Por otra parte, la fracción soluble en ácido, contiendo los ácidos fúlvicos, se aplica a una columna de resina hidrofóbica que permite separar la materia orgánica, XAD-8 o similar. Los ácidos fúlvicos se retienen en la columna y los restantes materiales pasan a través de la columna sin ser retenidos. La columna se trata con base y se desala, obteniendo una fracción de ácidos fúlvicos de bajo peso molecular sin impurezas. Frente al procedimiento convencional, este método permite separar fracciones adicionales, generando ácidos húmicos y fúlvicos de mayor pureza para fines comerciales.

Otra alternativa al método tradicional de extracción alcalina de Oden es el **método IHSS**, cuyo protocolo se utiliza a menudo como el método de referencia para la separación de sustancias húmicas y es ampliamente utilizado por los investigadores del área para fines de comparación y verificación de sus resultados (144, 145). Este método presenta modificaciones que mejoran la simplicidad en la extracción y la alta reproducibilidad frente a los métodos anteriores. Para reducir el ataque químico, los diferentes pasos se desarrollan bajo atmósfera de nitrógeno, se utilizan concentraciones bajas de ácidos y bases, las muestras se descalcifican con HCl antes del tratamiento y las fracciones se purifican con diálisis para eliminar las sales (146).

Los métodos que utilizan sustancias alcalinas para la extracción de sustancias húmicas son los más extendidos a nivel industrial, alcanzando unos rendimientos de extracción entre el 30 % y el 80 % (147). Adicionalmente, los resultados son altamente reproducibles. No obstante, todavía existen algunas características indeseables a tener en consideración, como la larga duración del procedimiento (entre 12 horas y 7 días) (148). Una modificación realizada con frecuencia consiste en la utilización de KOH como extractante, lo que permite disminuir los tiempos de extracción e incrementar los rendimientos respecto al método convencional con NaOH (149). Otras modificaciones incluyen la aplicación de extracciones sucesivas con el objetivo de aumentar los rendimientos de las diferentes fases de extracción (150). Como resumen a estos métodos se muestra la tabla 2.

Tabla 2. Resumen de métodos de extracción

	Método de Oden	Método de Stevenson	Método IHSS	Extracción con KOH
Extractante principal	NaOH	Na ₄ P ₂ O ₇	HCl	HCl
Tiempo de extracción (horas)	4-24	5-6	1	1
Extractante secundario	HCl	NaOH	NaOH	KOH
Tiempo de extracción (horas)	12	4	4	4
Duración total (días)	1-2	1-2	0,5-7	0,5-3
η total de extracción	≥40%	≥70%	≥60%	≥80%

Con los métodos anteriormente descritos se observan rendimientos altos de extracción, pero aun siendo los más utilizados tienen la problemática de la poca selectividad y el elevado tiempo hasta obtener el producto extraído. Como método más perfeccionado a nivel de extracción puede considerarse el desarrollado por el IHSS, que consigue rendimientos de extracción cercanos al 80%, aunque sigue siendo un proceso de larga duración.

La necesidad de solventar los aspectos problemáticos de la extracción con sustancias alcalinas ha dado lugar al desarrollo de otros métodos alternativos basados en la extracción con otros solventes (orgánicos) o con resinas.

1.3.2.- EXTRACCIÓN CON SOLVENTES

Se resumen, a continuación, las principales aplicaciones con solventes orgánicos para la extracción de sustancias húmicas.

El **método Soxhlet** ha sido empleado para realizar extracciones en secuencia logrando separar tres fracciones (151). Un ejemplo es el trabajo de Hayes [REF] en el que analizó las fracciones que contienen los ácidos húmicos y no bitumen. Para ello, Hayes estudió la extracción en secuencia usando acetona y una mezcla de benceno-alcohol. Como resultado se obtiene una fracción soluble en acetona, una fracción soluble en la mezcla y una fracción insoluble. La cantidad de fracciones solubles en solventes orgánicos aumenta con la disminución en el contenido de metoxilo en los ácidos húmicos. Las fracciones solubles tienen menor peso molecular que las fracciones insolubles. Los resultados pueden utilizarse para interpretar el proceso de humificación en suelos de ceniza volcánica (152).

Hayes también hizo una revisión de los sistemas de solventes acuosos y orgánicos utilizados para la extracción de sustancias húmicas de muestras de suelo (151). Entre los solventes orgánicos, comparó dimetilsulfóxido, etanol, formamida, piridina y acetonitrilo, que son comúnmente utilizados en la separación de compuestos orgánicos para la extracción de ácidos húmicos comerciales. Según la revisión de este autor, el acetonitrilo, la piridina y el etanol no son solventes adecuados para la extracción de ácidos húmicos y ninguno de los solventes estudiados resulta útil para la separación de todas las fracciones que se separan con el método alcalino.

En el trabajo de Kouchi (152), muestras de lignito fueron tratadas previamente con peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y posteriormente extraídas con mezclas de metanol y 1-etilnaftaleno, 2-metilnaftaleno y xileno. Los resultados muestran un rendimiento en la extracción del orden del 80 % para las mezclas de metanol y metilnaftaleno, mientras que se obtuvieron unos rendimientos del 35 % para la mezcla de metanol-xileno y del orden del 10-15 % para el carbón sin pretratamiento, como se muestra en el resumen de la tabla 3. Una ventaja del procedimiento es que se realiza a temperatura ambiente. Este estudio concluye que el método puede tener utilidad en el estudio de algunas fracciones orgánicas en carbones de bajo rango.

Tabla 3. Rendimientos de extracción de carbón pardo con diferentes tratamientos.

Pretratamiento	H ₂ O ₂	H ₂ O ₂
	MeOH-Metilnaftaleno	MeOH-Xileno
η _{total} de extracción	80%	35%
Sin pretratamiento	-	-
	MeOH-Metilnaftaleno	MeOH-Xileno
η _{total} de extracción	10-15%	10-15%

Con el uso de solventes orgánicos se obtienen valores altos en el rendimiento cuando se lleva a cabo un pretratamiento previo a la extracción. Cabe destacar la importancia de realizar este pretratamiento, ya que utilizando los mismos solventes de extracción el rendimiento aumenta hasta cinco veces lo obtenido sin pretratamiento.

1.3.3.- MÉTODO ALCALINO CON RESINAS CATIONICAS

La extracción de sustancias húmicas con el método alcalino en base a NaOH presenta interferencias cuando se tratan muestras de suelos calcáreos, ya que pueden ocurrir reacciones de oxidación. Se ha planteado la utilización de resinas de intercambio iónico de carácter aniónico fuerte como pueden ser las basadas en aminas terciarias y cuaternarias en matriz de poliestireno, quelatantes y de exclusión, para resolver dichos problemas y recuperar las sustancias húmicas.

En el trabajo de Okuda y Hori (153) para la extracción de sustancias húmicas a partir de lignito, se compara el método alcalino con NaOH según el esquema del IHSS con la extracción usando resinas de intercambio iónico como la comercial Amberlite® XAD-8 con carácter hidrofóbico y con alta capacidad de intercambio desde pH 2 (148). La muestra se trató con NaOH 0.5 M (10 g muestra/200 mL de NaOH) durante 60 min, se centrifugó y se filtró. Del filtrado, una porción se trató con la resina de intercambio catiónico en forma sódica y la fracción restante se procesó con el método IHSS. Los resultados indican que los ácidos obtenidos al aplicar la resina catiónica son más puros que los obtenidos con el tratamiento de NaOH, debido principalmente al carácter selectivo de la resina. Los ácidos obtenidos de la resina muestran una menor presencia de productos de oxidación, según lo evidencia la comparación de los espectros infrarrojos.

En otro trabajo, Serra y Schnitzer compararon dos tratamientos en dos muestras de un suelo franco arenoso (154). Una muestra fue sometida a un tratamiento con H₂SO₄ 0,1N para descalcificarla y se extrajeron las sustancias húmicas con NaOH 0,5N y H₂SO₄ 5N. La otra muestra se utilizó directamente para extraer las

sustancias húmicas por contacto con una resina quelatante Dowex A-1. Los ácidos húmicos y fúlvicos separados por ambos procedimientos se compararon, generando esteres metílicos mediante oxidación con KMnO_4 . Los productos obtenidos con ambos procedimientos presentaron diferencias en composición, por lo que se concluye que se extraen diferentes tipos de estructuras húmicas debido principalmente a las diferencias de tamaño existentes en las sustancias húmicas que hacen que una resina tenga más capacidad de extraer que otra. El método utilizando resina quelatante tiene la ventaja de ser más sencillo y consumir menos tiempo que la extracción alcalina. Este método se propone como complemento al método alcalino en estudios detallados de la estructura de las sustancias húmicas.

Otro ejemplo de extracción con resinas catiónicas, lo constituye la investigación de Ohene Apea que estudió tres resinas naturales obtenidas de exudados de plantas para la absorción de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos obtenidos de muestras de suelo por extracción alcalina convencional (155). Las resinas, activadas durante 10 horas en solución de pH 1, se mezclaron con soluciones de ácido húmico y ácido fúlvico manteniendo el contacto durante 10 horas. Las soluciones se filtraron y en los filtrados se determinó el contenido de carbono comparándolo con las soluciones originales ácidas. De las resinas estudiadas, las procedentes de *Anarcadium occidentale*, *Mangifera indica*, *Euphorbia tiricalli* y *Havea brasilienses* mostraron afinidad con los ácidos húmicos y fúlvicos, mientras que las resina de *Bowswellia sacra* no absorbió ninguno de los ácidos empleados. Se observó selectividad frente a los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos. La mayor eficiencia de extracción para los ácidos húmicos (83,8 %) se obtuvo con *Euphorbia tiricalli*, mientras que, para los ácidos fúlvicos, la mayor eficiencia de extracción obtenida fue de 77,3 % para *Anarcadium occidentale*. Este trabajo abre las puertas a la exploración de otras resinas naturales para estas aplicaciones.

Finalmente, en el trabajo de Rezonik se investigó la eficacia de las resinas de intercambio aniónico di-etil-amino-etil-celulosa (DEAE) y XAD-8 en el estudio de la materia orgánica disuelta (MOD) en aguas naturales (156). La resina XAD-8 opera por adsorción inespecífica de fracciones de MOD relativamente hidrofóbicas, siendo utilizada en el método de la IHSS para la extracción de materias húmicas acuáticas. Las resinas DEAE permiten extraer la materia orgánica disuelta por intercambio aniónico con grupos carboxilato y se aplican para extraer biomoléculas complejas en el campo de la bioquímica. En este trabajo se aplicaron por primera vez las resinas de intercambio aniónico vez al campo de las sustancias húmicas acuáticas.

1.3.4.- MÉTODOS MIXTOS DE EXTRACCIÓN

En esta sección se discuten algunos de los denominados métodos mixtos, en los cuales se utilizan soluciones alcalinas y básicas, solventes y otros materiales. En general, estos métodos se utilizan para fines de

investigación cualitativa de la composición de las sustancias húmicas ya que, por su tediosa metodología, resultaría ineficiente en un proceso industrial.

El **método Baglieri** es un esquema de extracción secuencial empleando sustancias alcalinas y solventes (Figura 7). Este método permite, después de la extracción alcalina con NaOH, separar cuatro fracciones adicionales. La separación a diferentes pH- (1, 3, 5 y 7) permite la caracterización de las fracciones en su composición y poder cuantificar el contenido en grupos OH, así como el contenido elemental de C, H y N. Con esta caracterización se puede analizar la distribución de masas de las sustancias húmicas para su posterior aplicación en complejación de micronutrientes, remediación de suelos, etc. (150). El criterio básico para el desarrollo del procedimiento fue que las sustancias elegidas no deteriorasen las sustancias húmicas presentes y permitiesen extraer sustancias adicionales a los ácidos húmicos y fúlvicos. El residuo de la extracción alcalina se trata con glicerol en dos etapas, luego con ácido cítrico y finalmente con una mezcla de NaOH y $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$. Posteriormente a cada tratamiento, la muestra se centrifuga, separando el precipitado. La caracterización de estas fracciones permite identificar una serie de sustancias en la fracción de huminas que presentan diferencias en la composición con los ácidos húmicos y fúlvicos originalmente separados.

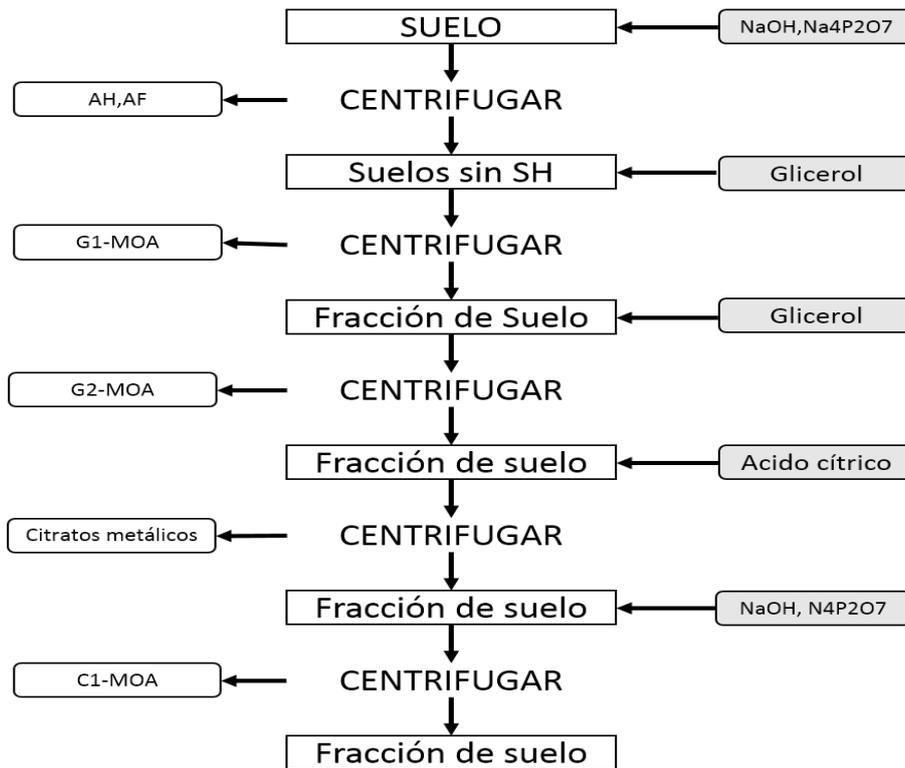


Figura 7. Método mixto para aislar materia orgánica después de la extracción de ácidos húmicos y fúlvicos (150).

La utilización de glicerol y de ácido cítrico en este método permite un tratamiento poco agresivo de los materiales, mientras que las fracciones obtenidas dan información adicional sobre la composición de la materia orgánica presente en las sustancias húmicas. El glicerol expande las capas del complejo arcillo-húmico, liberando sustancias húmicas. El ácido cítrico forma complejos con los metales permitiendo la separación de los mismos. En el trabajo de Baglieri, se obtuvieron cantidades suficientes para la caracterización química de las distintas fracciones, observándose diferencias de composición en las mismas y en función de los tipos de suelo estudiados. Este método es una opción cuando se quiere caracterizar detalladamente la composición de diferentes muestras de suelo y es particularmente apropiado para la caracterización de la fracción de huminas (150).

Otro **método mixto** es el conocido como **método de humeómica** (traducción literal de *humeomics*). Se trata de un método de fraccionamiento directo secuencial para la extracción de las sustancias húmicas y otros materiales presentes en la materia orgánica del suelo, conservando parte de su composición sin ser modificada por los tratamientos impuestos (157, 158). Este método incorpora un fraccionamiento menos agresivo desde el punto de vista químico que la extracción alcalina y permite obtener 9 fracciones químicamente diferentes. El método recupera un 235 % más de carbono orgánico que el método alcalino y

el 66 % del carbono no extractable por el método alcalino puede solubilizarse con el esquema *humeómica*. El esquema de extracción propuesto para este método es el mostrado en la Figura 8. El método consiste en una extracción fraccionada en cuatro etapas. Primero se lleva a cabo una extracción con diclorometano-metanol. En segundo lugar, con una mezcla al 10% de trifluoruro de boro y metanol. A continuación, con potasa y metanol y finalmente con ácido yodhídrico. En cada una de las extracciones se utilizan diferentes solventes hasta obtener las diferentes fracciones de las sustancias húmicas de una forma más específica.

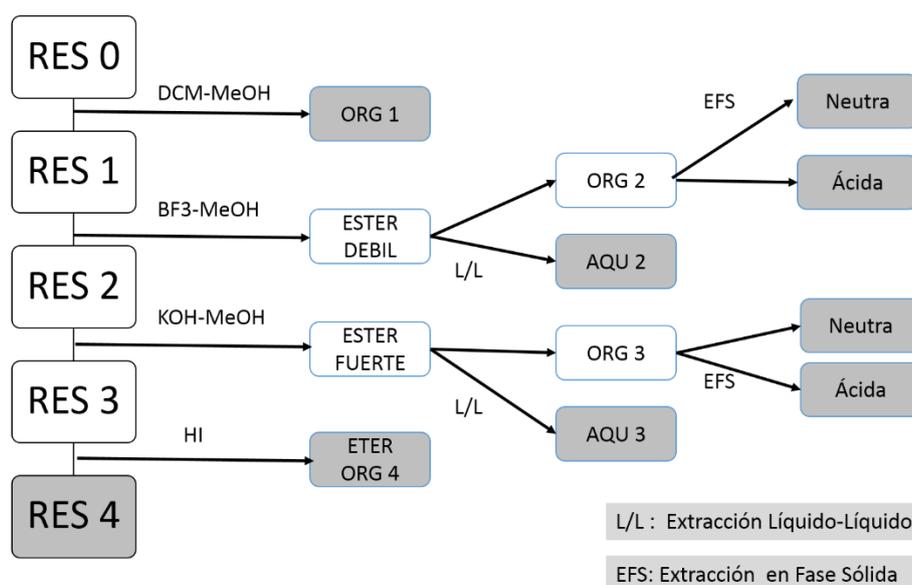


Figura 8. Esquema de fraccionamiento propuesto por *humeómica* (158). DCM (diclorometano); MeOH (Metanol); BF3 (trifluoruro de boro); HI (ácido yodhídrico).

El método de *humeómica* se ha empleado para la identificación de estructuras que permitan obtener una mejor comprensión de la composición de las sustancias húmicas. Los materiales a utilizar como extractante y la secuencia de aplicación se han diseñado para minimizar los potenciales cambios estructurales. En el trabajo de Piccolo, se utilizan técnicas analíticas avanzadas, como el método de *humeómica* que proporciona una mejoría en la caracterización de las diferentes fracciones respecto al método alcalino, logrando determinar 249 moléculas diferentes, mientras que con el segundo sólo se detectaron 23. Estos resultados muestran el potencial del método para la caracterización de la estructura de las sustancias húmicas.

1.3.5.- CONCLUSIONES DE LOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRACCIÓN.

Para la extracción de sustancias húmicas se dispone de una variedad de métodos. La selección del método apropiado depende del tipo de muestra y de los objetivos a lograr. La obtención de sustancias húmicas de

forma natural tiene una larga duración, por dicho motivo se han desarrollado diferentes métodos que aceleran el proceso y aumentan su rendimiento.

El método de extracción alcalina en base a NaOH es el más referenciado en los trabajos de investigación ya que ofrece los mayores rendimientos de extracción, llegando en algunos casos a superar el 80 %, dependiendo de la muestra y las condiciones de su utilización. Como desventajas, se destacan su baja selectividad en las sustancias húmicas, la larga duración del proceso y la reproducibilidad variable del método en función del material precursor. Además, la utilización de sodio a través de la base, hacen inviable su transferencia directa a un proceso industrial.

Para superar esta barrera, se han desarrollado nuevas variaciones del método, sustituyendo el NaOH por otros reactivos tales como KOH, sales neutras como $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$, solventes, resinas de intercambio iónico y resinas quelatantes. El cambio de NaOH por estos solventes reduce los rendimientos de extracción a la mitad en el caso de utilizar sales neutras, resinas de intercambio iónico y quelatantes y en menor medida por su carácter de base fuerte para el KOH. Cabe destacar que el uso de estos reactivos penaliza en el rendimiento, pero maximiza los resultados en la selectividad de las sustancias húmicas obtenidas, sobre todo en el caso del uso de resinas, que dotan al método de un resultado en la selectividad por encima del cualquier otro solvente. Los tiempos que estos métodos consumen en la extracción son elevados y difícilmente extrapolables a procesos industriales, siendo estos tiempos muy semejantes al utilizar NaOH. Alternativamente a los métodos alcalinos, se han desarrollado nuevos métodos que basados en estos buscan no sólo maximizar la capacidad de extracción sino también aumentar la capacidad de separación y facilitar su caracterización.

La primera alternativa consiste en la utilización de solventes orgánicos para el fraccionamiento de los ácidos. En comparación con los métodos alcalinos, estos métodos requieren el uso de pretratamientos con diferentes solventes como el H_2O_2 , para alcanzar valores altos de extracción, no superando en ningún caso extracciones superiores al 80%, pero con la ventaja de la reducción en los tiempos de extracción.

En paralelo a los métodos con solventes, se llevaron a cabo desarrollos de metodologías de extracción con resinas catiónicas, que tienen como principal característica la selectividad en comparación con los métodos anteriores. Estos métodos con solventes no consiguen obtener rendimientos semejantes a los métodos alcalinos si no se les realiza un pretratamiento, en cuyo caso sí que se obtiene un rendimiento de extracción cercano al 80%, pero penalizando en el tiempo del proceso, que es muy superior al necesario en la extracción alcalina. Esta selectividad viene dada por la clasificación en el tipo de resinas a utilizar, ya que en función del

tipo de material de construcción y el material de sujeción en la resina, es posible la separación por tamaños de las sustancias húmicas. Una mayor selectividad en la separación con resinas permite una mejor identificación y caracterización de las sustancias húmicas.

Como cada conjunto de métodos proporciona unas ventajas diferentes, se desarrollaron los métodos mixtos. La unión de los métodos de extracción alcalinos, con solventes y resinas dota al método combinado de todas las virtudes antes mencionadas, como son la capacidad de extracción, la reducción del tiempo y la selectividad. Sin embargo, este tipo de métodos mixtos requieren una compleja y costosa metodología de extracción, lo que reduce su viabilidad para un uso industrial, quedando su aplicación relegada al ámbito de trabajos de investigación en laboratorios.

Finalmente, también cabe destacar que, dentro de las múltiples metodologías disponibles en la extracción de sustancias húmicas, para garantizar rendimientos de extracción elevados y reproducibles para su uso industrial, es fundamental optimizar los parámetros de extracción. Para ello, se han empleado estrategias de diseño de experimentos (159, 160), estrategias secuenciales (141, 143) y comparación pareada (161), entre otros enfoques. Los diferentes materiales y condiciones de proceso obligan a considerar la realización de estas estrategias para la obtención de resultados.

1.3.6.- REVISIÓN DE PATENTES

Uno de los objetivos del presente trabajo es el desarrollo de un procedimiento de extracción que pueda ser aplicado a escala industrial, por lo que, a continuación, se lleva a cabo una revisión de diferentes patentes sobre procesos de extracción de sustancias húmicas que han sido utilizadas a nivel industrial. La mayoría de los procesos industriales tienen su base en los métodos de extracción antes explicados.

El análisis de patentes para desarrollar nuevos procesos industriales es una herramienta que permite a una organización lograr algunos de los siguientes objetivos:

1. Evaluar el avance de una tecnología determinada en términos de procedimientos, procesos, productos y mejoras.
2. Conocer los procesos y productos de un área particular y su situación legal. Una patente vigente puede ser costosa mientras que una patente vencida es de dominio público.

3. Reducir o eliminar esfuerzos duplicados. Las tecnologías probadas son soluciones a problemas concretos que se pueden encontrar en una organización.
4. Conocer los centros y personas que lideran el campo tecnológico particular.
5. Explorar nuevas aplicaciones potenciales para productos o procesos existentes.

En la presente revisión se ha llevado a cabo la búsqueda de los procesos de extracción de sustancias húmicas a partir de carbón ya que, aunque existen otras fuentes de obtención de sustancias húmicas a partir de materiales biodegradables ricos en carbono tales como los estiércoles, biomasa vegetal de coberturas vegetales como son los restos hortícolas, restos de la industria alimentaria, etc., estas materias primas requieren de pretratamientos como la separación y secado para obtener un producto homogéneo antes de pasar a los diferentes procesos de extracción, además de otras condiciones relacionadas con la estacionalidad (por ejemplo, no siempre se dispone de restos hortícolas) y la disponibilidad de cantidades suficientes que aseguren una continuidad en el suministro. Por dicho motivo, la materia prima más utilizada es el carbón y sus derivados que, además de tener una homogeneidad y continuidad en la disponibilidad en la mina, tiene un contenido en carbono muy superior al resto de materias primas. Además de valorar lo anteriormente expuesto, dada la relación y compromiso de Fertinagro Biotech S.L., y en particular de este trabajo de Tesis Doctoral, con la provincia de Teruel, se quiere destacar que ante los cierres de las centrales térmicas de carbón de la provincia, la utilización del carbón excedentario autóctono como materia prima para la producción de fertilizantes abre una alternativa industrial para la reconversión del sector minero que permita fomentar la creación de empleo, mitigar la despoblación y vertebrar el territorio. Esta revisión permite evaluar como la unión de los diferentes métodos de extracción dan lugar a procesos industriales con rendimientos de extracción elevados con bajos tiempos de proceso.

Se presenta, a continuación, un resumen de las patentes revisadas que guardan una mayor relación con el objetivo propuesto en la presente tesis doctoral:

1. Tomioka plantea la formación de un ácido nitrohúmico con magnesio en un proceso continuo llevado a cabo en un reactor de mezcla horizontal a partir de lignito, ácido nítrico y magnesita. El producto es sólido y presenta una buena solubilidad, obteniéndose rendimientos entre el 60 y el 70 %. (162)

2. Schwartz expone un tratamiento de material carbonáceo con sulfito o bisulfito de sodio, potasio o amonio, reaccionando bajo reflujo, lo cual genera ácidos húmicos sólidos solubles hasta pH 4.5. La reacción tiene un rendimiento del orden del 20 %. (163)
3. Stephen plantea un proceso continuo de oxidación de carbón de bajo rango con ácido nítrico en contracorriente. No requiere aplicación externa de calor y el producto es un sólido. (164)
4. Calemma describe un proceso en lecho fluidizado utilizando carbón de bajo rango en el que se obtienen ácidos húmicos con rendimientos entre el 73 % y el 88 %, dependiendo del tipo de material empleado. La oxidación se realiza en base seca, con mezclas de oxígeno y nitrógeno o únicamente oxígeno. El proceso es muy flexible ya que permite ajustar las condiciones del mismo de acuerdo al tipo de carbón y su granulometría. (165).
5. Detroit describe un proceso para obtener ácidos húmicos sulfoalquilados a partir de la reacción de un carbón de bajo rango, formaldehído y sulfito o bisulfito de sodio, potasio o amonio. El producto resultante es un líquido concentrado que puede secarse, presenta buena solubilidad incluso a pH bajo y es compatible con mezclas de fertilizantes para su aplicación en campo. (166)
6. Calemma y Rausa plantean un proceso de producción de ácidos húmicos “regenerados” utilizando dos reactores de lecho fluidizado en serie, en el que, carbón finamente pulverizado se oxida en la fase gaseosa con mezclas de oxígeno y nitrógeno. Las condiciones de proceso pueden variar en función del material disponible, alcanzándose rendimientos de extracción entre el 50 % y el 60 %. (167)
7. Vladimir Sevastyanov presenta un proceso mecánico-químico para convertir carbones de bajo rango en fertilizantes organominerales (sales de ácidos húmicos) y briquetas para combustible. Se emplea un proceso en flujo continuo para lixiviar, coagular y separar los productos. Los flujos de materiales se pueden cambiar en función de los insumos y el producto requerido, facilitando la flexibilidad del proceso productivo. El método permite manejar un amplio rango de materiales de diferente viscosidad. No se reportan rendimientos ni condiciones de proceso. Sin embargo, en la patente se contempla la posibilidad de generar diferentes productos líquidos y sólidos, dependiendo de las condiciones de operación, y se afirma que los productos obtenidos son de alta pureza. (168)
8. Shulgin describe un proceso sencillo para obtener un reactivo húmico-mineral en forma granulada. Un material carbonáceo, como lignito o turba, se muele, se hidrata y se mezcla con un álcali seco. La reacción exotérmica eleva la temperatura hasta 70 -75 °C. El material se coloca en sacos termorresistentes y se permite que la reacción tenga lugar durante 2 a 3 días. Una vez que vuelve a la temperatura ambiente, se retira el material y se prepara para su venta. Esta

patente protege la aplicación del producto como fertilizante, como insumo para fabricar sales húmicas, como enmienda para suelos, como activador biológico y para su uso en la descontaminación de aguas y suelos (169).

1.3.6.1.- Título: Process of producing a soil nutrient by reacting a humic matter with nitric acid (162).

Referencia: Patente US 3193300, julio 27, 1965

Inventor: Tomioka, Shigenori

Objeto

El objeto de esta patente es el desarrollo de una mezcla de sustancias con diferentes materias primas usadas como fertilizantes, que son activadas con ácido para la obtención de ácidos húmicos en la propia mezcla fertilizante.

Este procedimiento está relacionado con el método de extracción IHSS, en el que la extracción es llevada a cabo en medio ácido con HCl. En esta patente el ácido clorhídrico es sustituido por ácido nítrico por dos razones. La primera es que el ácido clorhídrico y, más en concreto el cloro, quedaría en el producto final de la extracción siendo perjudicial para los cultivos. La segunda es que el ácido nítrico aporta nitrógeno, que es uno de los principales macronutrientes.

Descripción del proceso

En un mezclador se carga el material conteniendo sustancias húmicas (lignito, turba o restos vegetales), se mezcla con el material que contiene magnesio y se agrega HNO_3 . La reacción se genera en un mezclador horizontal equipado con paletas, calentando a una temperatura entre $60\text{ }^\circ\text{C}$ y $120\text{ }^\circ\text{C}$, dependiendo de la mezcla de materiales utilizada. El producto es una sal de magnesio de ácido nitrohúmico.

Diagrama

En la figura 9, puede observarse el diagrama de proceso, que se realiza en la patente de Tomioka, S.

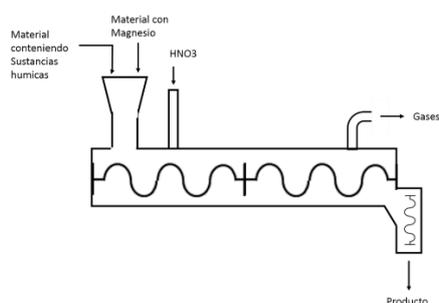


Figura 9. Esquema de la patente US 3193300

Ventajas

- Permite la operación continua.
- No requiere un control preciso de temperatura o velocidad, ni la aplicación externa de calor.
- Los tiempos de reacción son cortos.
- Requiere baja cantidad de energía para la agitación.
- Permite utilizar diferentes materiales conteniendo sustancias húmicas (lignito, turba o césped) y diferentes materiales conteniendo magnesio (serpentina, dolomita o magnesita).
Los materiales pueden usarse sin molienda previa.
- Bajo coste inicial.

1.3.6.2.- Título: Production of humic acid (163).

Referencia: Patente US 3398186, agosto 20, 1968

Inventor: Schwartz, Nelson

Objeto

Los ácidos húmicos presentes en una muestra de carbón se pueden recuperar aplicando una solución de sal de sulfito a un pH de al menos 6, separando los materiales insolubles, acidificando a, al menos, pH 4.5 y extrayendo los ácidos húmicos sólidos.

Este procedimiento puede asimilarse al método de extracción descrito por Oden a diferencia en la utilización de sulfito y bisulfito de sodio en vez de NaOH. De este modo, además de llevar a cabo la extracción, Schwartz utiliza sulfito o bisulfito indistintamente que aporta azufre al fertilizante final. Esto resulta beneficioso en la fertilización de suelos con pH básico.

Descripción del proceso

Una muestra de carbón (lignito o carbón oxidado) se muele finamente, se agrega a una solución extractante conteniendo sulfito de sodio o bisulfito de sodio, se ajusta el pH, se somete a reflujo por un tiempo determinado y la solución resultante se filtra para separar los materiales no solubles. La solución filtrada se acidifica y el precipitado, conteniendo los ácidos húmicos, se seca y se pesa.

Diagrama

En la siguiente figura 10 se muestra un diagrama de bloques con el esquema básico del proceso.

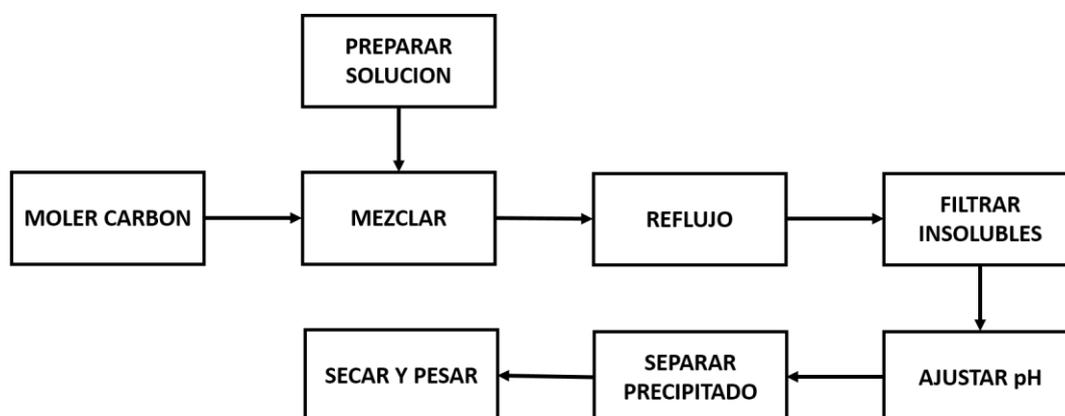


Figura 10. Diagrama de flujo de la patente US 3398186

Ventajas

- Se demuestra la utilidad de los sulfitos de sodio, potasio y amonio para preparar ácidos húmicos.
- Los ácidos húmicos se pueden producir in situ junto con SO_2 gaseoso.
- El proceso permite obtener concentraciones de la sal de humato del orden del 20 %, lo cual es mayor que lo obtenido con extracción cáustica simple, que alcanza el 8 %.

Ejemplos:

1. 100 g de leonardita finamente molida se extraen con una solución conteniendo 8 g de sulfito de sodio (Na_2SO_3), 20 g de NaOH y 372 g de agua. La solución se queda a un pH de 13,7 y se mantiene a reflujo durante 60 horas. En la mezcla final se obtienen 14,7 g de sólidos. La solución filtrada se acidifica con HCl. El precipitado se seca y se pesa, obteniéndose 85,2 g de ácidos húmicos.
2. Se prepara una solución con 2 g de bisulfito de sodio (NaHSO_3) y 290 g de agua y se ajusta el pH a 6,5 con NaHSO_3 . Se agregan 100 g de leonardita finamente molida y la mezcla se calienta a reflujo durante 60 horas. Al final se obtienen 39,9 g de compuestos insolubles. A continuación, se lleva a cabo una filtración y se acidifica el filtrado con HCl hasta pH 2. El precipitado se separa y se seca. En este ejemplo se obtuvieron 60,1 g de ácidos húmicos.

3. Una porción de carbón se oxida con aire a 200 - 240 °C en lecho fluidizado. 100 g de carbón oxidado se adicionan a una solución conteniendo 10 g de NaSO₃ en 290 g de agua. Esta solución tiene un pH de 9,9. La solución se lleva a reflujo durante 19 horas para posteriormente llevar a cabo una separación en la fracción insoluble obteniendo 40 g. La solución filtrada se acidifica hasta pH 2 con HCl. El precipitado oscuro se seca y se pesa, obteniéndose 60 g de ácidos húmicos.

1.3.6.3.- Título: Continuous nitric acid oxidation of coal (164).

Referencia: Patente US 3468946, septiembre 3, 1969

Inventor: Stephen, Mark. C.

Objeto:

La patente establece un proceso continuo para la oxidación de carbón de bajo rango con ácido nítrico concentrado. El método evita la necesidad de calentar o enfriar todo el proceso de reacción, elimina la producción de subproductos acuosos ácidos y permite obtener directamente un producto seco.

El proceso llevado a cabo en esta patente está relacionado con el método de extracción IHSS, pero sustituye el HCl por el ácido nítrico con el objeto de aportar nitrógeno en vez de cloro que es desfavorable para la fabricación de fertilizantes.

Descripción del proceso:

En un transportador de tornillo doble inclinado, se carga por la parte inferior el carbón de bajo rango. A lo largo del tornillo, se va adicionando ácido nítrico concentrado. La reacción de oxidación se desarrollada a lo largo del tornillo. El producto final se obtiene seco y listo para ser utilizado en la extracción de ácidos húmicos.

Diagrama

En la siguiente figura se muestra un esquema simplificado del proceso. Se indican los puntos de adición de ácido nítrico y de carbón junto con la dirección del flujo del producto.

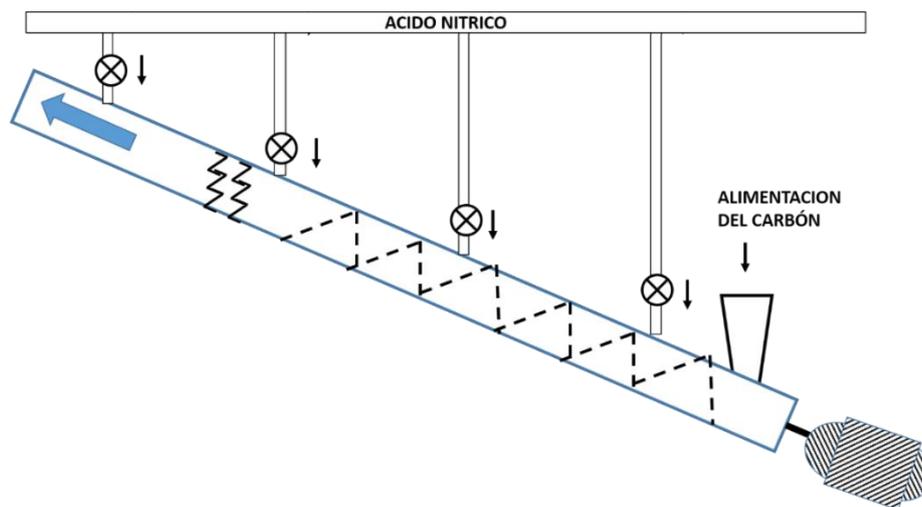


Figura 11. Esquema de la patente US 3468946.

Ventajas

- El movimiento del material a través del tornillo permite controlar el calor generado por la reacción y aprovecharlo para obtener un producto seco.
- Los gases de reacción se utilizan para el secado del producto.

Desventajas

- El calor de reacción se desperdicia y debe de ser disipado agregando costos al proceso.
- La necesidad de controlar el calor de reacción obliga a utilizar concentraciones de ácido nítrico inferiores al 50%.
- Se generan gases, resultantes de la mezcla de oxígeno y ácido nítrico, que no se utilizan en la reacción y deben ser reprocesados en un sistema secundario.
- Los ácidos húmicos se recuperan en una solución acuosa, deben de lavarse los ácidos residuales y secarse, lo que exige equipamiento y tiempo adicional.
- Existe peligrosidad en el manejo del ácido nítrico.
- Existe una alta corrosión en los materiales utilizados.

Ejemplos

Se presentan los resultados de algunos ensayos del sistema.

Tabla 4. Resultados de la patente US 3468946

Adición de Carbón, g/min	HNO ₃ , L/H.	% Ácidos Húmicos	Evolución de Gases
300	14	43,0	Extensa
1000	14	46,0	Moderada
1000	7	26,7	Ligera
340	7	36,7	Moderada
Carbón Original		3,1	

1.3.6.4.- Título: Proceso para la producción de ácidos húmicos regenerados a partir de carbón (165).

Referencia: Patente europea 0 272 737, 07.12.1987

Inventores: Vincenzo Calemma. Eniricherche S.p.a., Italia

Objeto

El proceso comprende la oxidación de carbón en fase seca con oxígeno o mezclas oxígeno y nitrógeno en un reactor de lecho fluidizado, utilizando carbón con granulometría entre 100 µm y 3 mm, operando a una temperatura entre 150 y 300 °C, bajo presión parcial de oxígeno entre 1,1 y 10 atm abs., para un tiempo de contacto entre 300 y 600 minutos.

Este proceso de extracción es un proceso de oxidación similar al método de extracción IHSS, pero además de la adición de un ácido también aporta oxígeno o mezclas de este para favorecer la velocidad de oxidación y con ello la cinética de reacción del proceso de extracción.

Ventajas

- El proceso es muy flexible. Puede manejar como insumos tanto lignitos como carbón subbituminoso con diferentes granulometrías, permitiendo variar las condiciones de temperatura y tiempo de contacto.
- Los productos de la reacción se extraen con solución alcalina para obtener los ácidos húmicos.
- Los rendimientos de ácido húmico se encuentran entre el 73 y 88 %.
- El proceso descrito supera las desventajas de los procesos que utilizan oxidación con ácido nítrico u oxidación con oxígeno en fase acuosa a pH básico o a pH ácido.

Desventajas

- Las desventajas del proceso con ácido nítrico son:
 - Alto consumo de reactivos, lo que conlleva costos superiores al precio del producto.
 - Baja selectividad en la formación de ácidos húmicos.
 - Tiempo de reacción largos.
 - Problemas en el manejo y con la corrosión.
- Las desventajas de la oxidación con oxígeno en fase acuosa a pH básico son:
 - Rendimientos bajos.
 - Alto consumo de álcali.
 - Presión parcial de oxígeno alta.
 - Baja selectividad de los productos.
- Las desventajas del proceso con oxígeno en fase acuosa a pH ácido son:
 - Alto consumo de materiales costosos.
 - Tiempos de reacción largos.

1.3.6.5.-Título: Producción de humatos solubles en ácido (166).

Referencia: Patente europea EP 0786490 A2. 26.01.1996

Inventor: Detroit, William

Objeto

Un mineral conteniendo ácidos húmicos, como la leonardita, el lignito o la turba, se hace reaccionar con formaldehído y un agente sulfoalquilante, como el bisulfito o el metabisulfito de sodio, potasio o amonio, después de ajustar la mezcla de reacción con álcali a un pH entre 9 y 12. La reacción se desarrolla bajo condiciones determinadas de temperatura y presión por un tiempo suficiente para producir un ácido húmico sulfoalquilado concentrado. Los insolubles se eliminan por filtración, centrifugación o sedimentación obteniendo un ácido húmico sulfoalquilado concentrado que es soluble al menos en 75 % en peso a un pH 0.5 o menor. El concentrado puede ser secado por aspersión para obtener un polvo.

El proceso descrito en esta patente es una mezcla del método de Oden, pero introduciendo además del bisulfito o el metabisulfito de sodio, otros tipos de soluciones básicas para la extracción como son el hidróxido de potasio y el amoniaco. A diferencia del **método de Oden** este proceso es llevado a presión y temperatura lo que permite reducir los tiempos de extracción aumentando la cinética de la reacción.

Diagrama

En la figura 12 se muestra el diagrama de la patente y de qué forma evoluciona en su desarrollo.

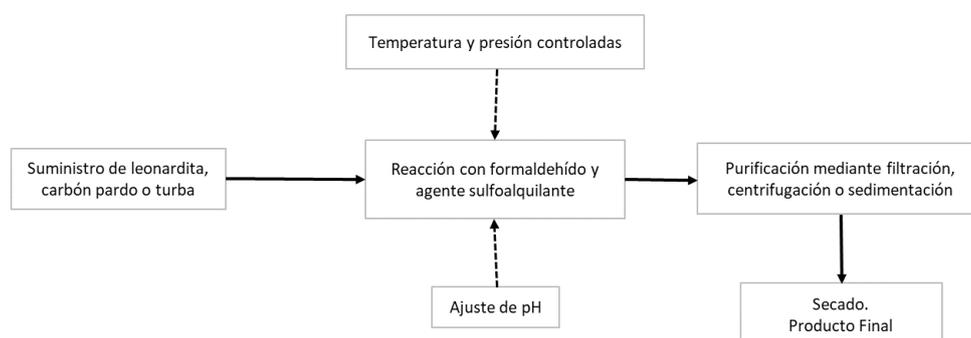


Figura 12. Diagrama de bloques Patente EP 0786490 A2

Ventajas

- El producto obtenido tiene buena solubilidad en soluciones ácidas y en soluciones complejas de fertilizantes a pH bajo.
- El producto puede obtenerse como un líquido o un polvo, con rendimiento del 70 al 75 %.
- El proceso es flexible en cuanto a los insumos.
- Se plantea como un proceso simple y relativamente económico de obtener los concentrados de ácido húmico solubles en ácido.
- Se obtienen soluciones de altos sólidos con viscosidad baja.
- Las condiciones pueden ser variadas para controlar la extensión de la sulfoalquilación, la cual mejora la solubilidad.
- Los ácidos húmicos producidos tienen una buena solubilidad en mezclas complejas de fertilizantes y a pH bajos.

1.3.6.6.- Título: Process for producing regenerated humic acids from coal (167).

Referencia: Patente US 5248814. Septiembre 28, 1993 (Idéntica a la Patente europea 92202619.0 y la patente canadiense CA 1294951C, 1986)

Inventores: Calemma, Vincenzo y Rausa, Riccardo

Objeto

Un material carbonáceo (lignito, carbón subbituminoso o carbón bituminoso) molido finamente se carga a un reactor donde se lleva a cabo una oxidación primaria, el contenido de hidrógeno se reduce entre un 5 y un 25 %. Posteriormente el material se transfiere a un reactor secundario, donde se completa el proceso de oxidación. En ambos procesos de oxidación se introduce oxígeno y aire a presión como reactivos para así obtener sustancias húmicas. Las condiciones de presión parcial de oxígeno, temperatura de proceso, velocidad de fluidificación y tiempo de retención se determinan en función de las características del material carbonoso utilizado.

El proceso descrito en esta patente es semejante al proceso natural de extracción de sustancias húmicas, donde tiene lugar una oxidación con el oxígeno presente en el aire, pero llevado a cabo bajo condiciones de presión y temperatura para aumentar la velocidad de reacción.

Descripción del proceso

El proceso descrito empieza por la pulverización del carbón con un tamaño de 3-100 μm , para posteriormente someterle a una oxidación primaria a una temperatura entre 150 - 200 $^{\circ}\text{C}$, con un tiempo de contacto de 10 a 120 min. Para esta oxidación primaria la mezcla de aire y oxígeno debe de estar a una presión entre 0,2 a 6 atm. Una vez llevada esta oxidación primaria se lleva a cabo la oxidación secundaria a una temperatura entre 180 $^{\circ}\text{C}$ – 300 $^{\circ}\text{C}$ con un tiempo de residencia de 30 a 600 min. Una vez llevada a cabo ambas oxidaciones se extraen los ácidos húmicos.

Diagrama

En la figura 13 se muestra el diagrama de flujo simplificado para el proceso descrito.

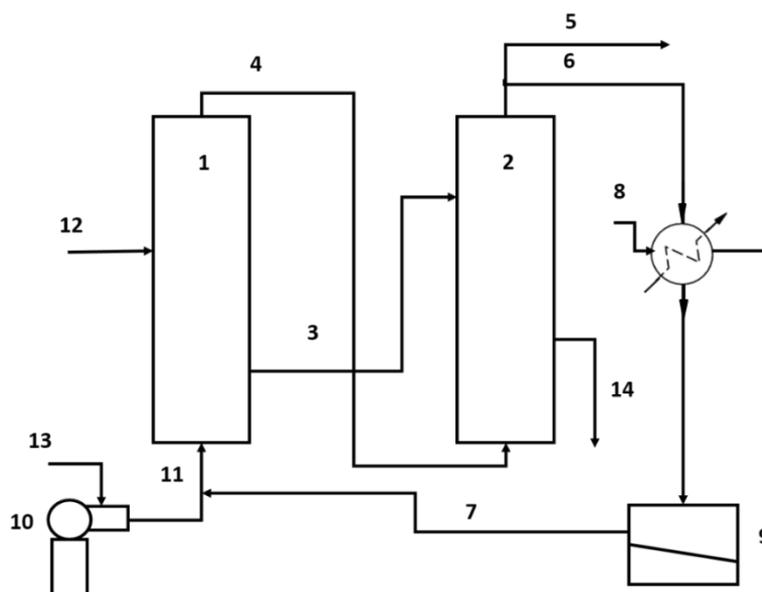


Figura 13. Diagrama de flujo del proceso. Patente US 5248814, 1993A partir de: Calemma.

Ventajas

- Se describen las ventajas y desventajas de los esquemas de oxidación del carbón en base a HNO_3 y óxidos nitrosos (Patente UK 1283385), en base a oxígeno en fase acuosa a pH ácido (Patente JP-70/10723), en base a oxígeno en solución acuosa a pH alcalino (Patente IT 1199808) y en base a oxígeno o aire en fase seca.
- Muestra el impacto en el rendimiento de ácidos húmicos, del proceso de oxidación previa para reducir el contenido de hidrógeno activo.

- Presenta referencias de la utilización de tres tipos de material carbonáceo, con las condiciones generales de proceso para cada material y los resultados de rendimiento en la extracción de ácidos húmicos en cada fase.

Variaciones y ejemplos

Las condiciones de proceso se ajustan según las características del material carbonáceo utilizado. Se muestran tres ejemplos (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados obtenidos en la patente US 5248814

	Carbón Sub-Bituminoso Montana Rosebud	Lignito Dakota del Norte	Carbón sub- bituminoso Illinois No. 6
Presión Parcial de Oxígeno, Kg/cm ²	1,47	1.26	0.45
Temperatura, C	200	160	200
Velocidad de fluido, cm/s	29	29	25
Velocidad de Alimentación, kg/Hr	3,7	25	24
Tiempo de retención, Min	60	80	90
% Ácidos Húmicos (Primera oxidación)	42	49	58
% Ácidos Húmicos (Segunda oxidación)	68	68	70

1.3.6.7.- Título: Method for comprehensively processing brown coal and leonardite into humic fertilizers and preparations into fuel briquettes and mechanochemical reactor for processing highly viscous media (168).

Referencia: US Patent, 2017/0036967 A1, febrero 9, 2017

Inventor: Sebastýanov, Vladimir

Objeto

El método propuesto expande las capacidades funcionales de los métodos conocidos para crear un proceso altamente efectivo y flexible para la manufactura de fertilizantes húmicos, orgánicos y organominerales y preparaciones húmicas con actividad biológica.

Al igual que las anteriores patentes este proceso de extracción se lleva a cabo con la combinación de varios métodos de extracción, en un primer momento una oxidación con agua oxigenada como el **método mixto**, para a continuación conjugar una extracción en medio ácido como el **método de IHSS** y una precipitación en medio básico.

Descripción del proceso

El proceso consiste en la oxidación previa de carbón de bajo rango, con H_2O_2 , una vez oxidado el material mediante tratamientos físico-químicos es transformado en diferentes fracciones. Una vez obtenidos los subproductos, son tratados con una disolución ácida dando lugar a la formación de flóculos provenientes de la separación de ácidos húmicos y fúlvicos. Tras esta formación de fases para una mejor separación entre parte sólida y líquida se le adiciona una base. Una vez separadas las fases, los productos finales son acondicionados para su almacenamiento tanto en sólido mediante un secado, como en líquido con una filtración y adición de sales.

Diagrama

Se muestra en la figura 14 un esquema simplificado del proceso. De acuerdo con el producto que se espera producir, se utilizan diferentes combinaciones de estos equipos y de los sistemas auxiliares.

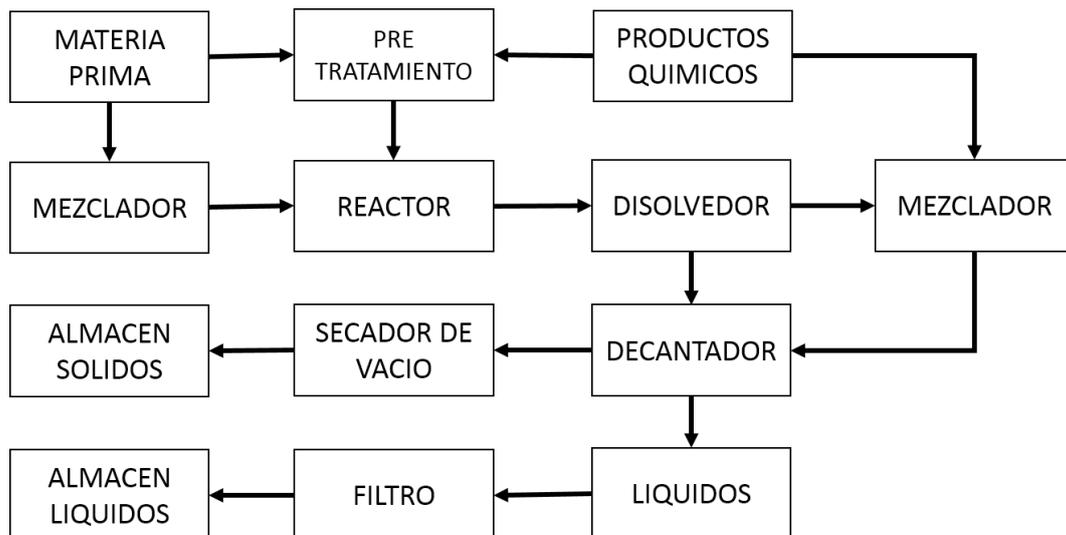


Figura 14. Diagrama de flujo de la patente 2017/0036967 A1

Ventajas del proceso

- Se trata de un proceso flexible que permite obtener una variedad de productos de utilidad en agricultura, en base a carbón de bajo rango (carbón pardo y leonardita).
- Permite obtener alto volumen de producción y tiene una elevada flexibilidad (permite utilizar diferentes materias primas y agentes de extracción).
- El cambio del patrón de producción es muy rápido. En términos de energía, los requerimientos de los motores y otros equipamientos son muy bajos, ya que se aprovecha el calor generado en diferentes etapas.
- Los desechos sólidos y semisólidos del proceso se revalorizan como combustible. Los desechos líquidos se tratan para separar y recuperar los sólidos disueltos.
- Variando las condiciones de proceso, se generan diferentes tipos de productos: fertilizante orgánico en gel, fertilizante organomineral en gel o preparaciones húmicas biológicamente activas.

1.3.6.8.- Título: Process for preparation of a granular humic mineral reagent (169).

Referencia: Patente US 9656109, mayo 23, 2017

Inventor: Alexander I. Shulgin

Objeto

Desarrollar un proceso que permita obtener un producto seco, granular, fácil de manejar, minimizando el uso de energía y a bajo costo.

El proceso descrito en esta patente está basado en los **métodos de Oden y de Stevenson**, con un pretratamiento de la muestra para reducir tamaño y con ello conseguir una mayor eficiencia en el rendimiento de extracción.

Descripción del proceso

Se lleva a cabo una molienda hasta obtener partículas de 1 mm a 8 mm de diámetro, a continuación, se mezcla con agua para posteriormente adicionar álcali lentamente (NaOH, KOH o mezcla de ambos) hasta un 18 % del peso del material carbonáceo seco. Se debe mantener la temperatura por debajo de 80 °C.

A continuación, se transfiere el material a bolsa térmicas y se mantiene durante 2 a 3 días hasta que se alcanza la temperatura ambiente.

Al terminar el proceso el producto está listo para su uso directamente o para ser procesado con otros materiales.

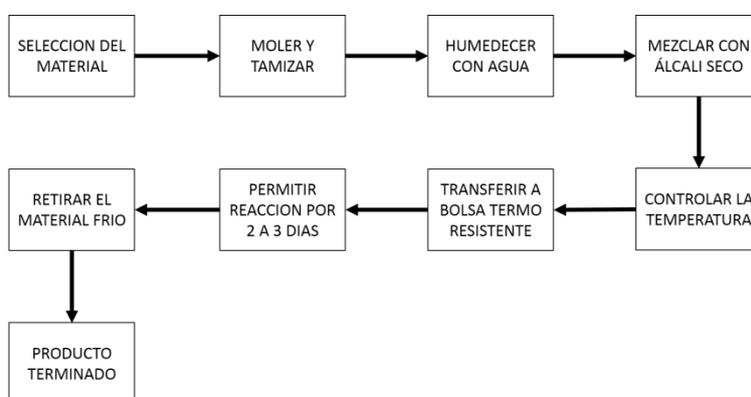
Diagrama

Figura 15. Diagrama de flujo de la patente US 9656109

Ventajas

- El proceso es sencillo, no requiere energía adicional y es de bajo coste.
- Los materiales de partida son fácilmente accesibles.
- El producto final es menos susceptible a degradación por visible o manejo.
- El producto puede ser mezclado directamente al suelo.
- Puede ser utilizado con otras materias primas para la fabricación de fertilizantes.

1.3.6.9.- Conclusiones apartado de patentes

Existen diferentes formas de realizar las extracciones en procesos industriales, cuya finalidad es optimizar el rendimiento y el tiempo de duración del proceso.

En la mayoría de patentes citadas anteriormente se utilizan los métodos de extracción alcalina, principalmente por sus buenos rendimientos, así como la facilidad en el manejo de sustancias químicas. Asimismo, existen varias patentes que utilizan ácido nítrico con un doble objetivo, el de llevar a cabo la extracción y el del aporte de nitrógeno a las sustancias húmicas que van a ser utilizadas como fertilizante. El uso de ácido nítrico en vez de ácido clorhídrico elimina la toxicidad del cloro en el fertilizante final, pero requiere de una gran seguridad en el manejo, así como en las instalaciones industriales por su alta corrosividad y peligrosidad.

En la tabla 6, puede verse la comparativa de los principales parámetros de interés en las patentes analizadas. Como se observa, los rendimientos de extracción son muy dispares teniendo valores desde un 88% para la patente desarrollada por Calemma (4) hasta un 20 – 25% para las patentes de Swartz (2) y Stephen (3) respectivamente. Esta disparidad es debida principalmente a las características propia de cada proceso. Cabe destacar que si bien el rendimiento máximo (88%) se obtiene en la patente de Calemma (4), este método también presenta el mayor tiempo de extracción (7 días). En este sentido, alcanzar un compromiso entre el rendimiento de extracción y la duración del proceso puede resultar clave en términos de eficiencia y costes para su implementación en un proceso industrial. En base a esta premisa, la patente propuesta por Calemma y Rausa (6) que tiene una duración de 16 horas como máximo con un rendimiento de un 60% puede resultar la alternativa que mejor conjuga ambos criterios. Otro factor de interés a considerar es el consumo energético. Se observa que la mayor parte de las patentes estudiadas a excepción de la descrita por Stephen (3) y Detroit (5), requieren de altas temperaturas de proceso lo que conlleva un alto coste energético.

Finalmente, el uso de diferentes tipos de solventes, además de su influencia sobre el proceso de extracción tienen un efecto sobre el valor agronómico de los productos finales. La utilización de ácido nítrico como solvente en las patentes de Tomioka (1), Stephen (3) y Calemma (4) suponen un aporte de nitrógeno, mientras que el empleo de hidróxido de potasio como solvente en las patentes de Detroit (5) y Shulgin (8), suponen un aporte extra de potasio. Por otro lado, la elección del tipo de solvente, también tiene unas implicaciones medioambientales y un sobre coste asociado a su eliminación que hay que tener en consideración.

Tabla 6. Tabla comparativa de las patentes analizadas

Patente	1 (Tomioka)	2 (Schwartz)	3 (Stephen)	4 (Calemma)	5 (Detroit)	6 (Calemma y Rausa)	7 (Sebastyanov)	8 (Shulgin)
ηextracción	60% - 70%	20%	25% - 45%	73% - 88%	Desconocido	50% - 60%	Desconocido	Desconocido
Solvente de Extracción	HNO ₃	Na ₂ SO ₃ / NaHSO ₃	HNO ₃	HNO ₃	Na ₂ SO ₃ / NaHSO ₃ /KOH/ NH ₃	H ₃ O ⁺	H ₂ O ₂ /H ₃ O ⁺	NaOH/KOH
Temperatura	60°C - 120°C	200°C - 240°C	Tª. Ambiente	150°C - 300°C	Tª. Ambiente	150°C - 300°C	Desconocido	<80°C
Método de Extracción	IHSS	IHSS	IHSS	IHSS	Oden	IHSS/Mixto	Mixto	Oden
Duración del método	1-2 días	4-5 días	1 día	5-7 días	ND	14-16 Horas	ND	3-4 días

Teniendo en cuenta todo lo expuesto, se concluye que, aunque todos los procesos descritos han sido diseñados para su implementación en el ámbito industrial, el uso de cada uno de ellos vendrá condicionado por los diferentes factores que rodean el proceso industrial como son principalmente las materias primas de partida (propiedades, disponibilidad, precio, transporte, etc.), y las características y costes del propio proceso (coste de energético, operación y mantenimiento de las instalaciones, necesidad de equipos auxiliares, pretratamiento y acondicionamiento del producto final, etc.). Así, por ejemplo, el método propuesto por Calemma (4) es el que presenta una mayor eficiencia de extracción, sin embargo, presenta unos costes variables altos, energía y reactivos principalmente, en comparación con otras alternativas que incurren en unos costes menores haciéndolos más atractivos y rentables para su explotación industrial.

En base a estos criterios, entre las alternativas propuestas, se destaca el procedimiento de Tomioka (1) ya que alcanza un buen compromiso entre el rendimiento de extracción y la duración del proceso, además de presentar unos costes variables inferiores a sus alternativas y un efecto positivo sobre el valor agronómico de los productos al utilizar ácido nítrico como solvente.

CAPÍTULO 2

La revisión de los métodos de extracción de las sustancias húmicas, así como de las patentes relacionadas más representativas, realizada en el Capítulo 1 constituye el punto de partida para alcanzar el objetivo principal de esta Tesis, consistente en desarrollar un proceso de extracción de sustancias húmicas a partir de carbón y una activación posterior de estas sustancias húmicas para poder ser utilizadas como fertilizante con micronutrientes complejados.

Los métodos alcalinos son, con diferencia, los más extendidos y los que consiguen mayores rendimientos, cercanos al 70-80%, además poseen una aceptable selectividad, como queda descrito en el método de Oden. Sin embargo, la extracción en medio básico tiene la problemática de ser un método con elevados tiempos de extracción y con un alto coste en el consumo de reactivos. Por este motivo, se han utilizado otros solventes de extracción, como los ácidos, que permiten una reducción del tiempo empleado, si bien de una forma moderada, pasando de tiempos de extracción en medio básico de 3-4 días, tal y como se describe en la patente de Shulgin, a 1-2 días, como se describe en las patentes de Stephen y Tomioka.

Para solventar o reducir los inconvenientes existentes, se han desarrollado otros métodos en los que se utilizan otros solventes y resinas orgánicas que permiten reducir el tiempo de extracción y aumentar la selectividad, respectivamente. Adicionalmente, también se han desarrollado métodos mixtos, que combinan los anteriores y que, si bien consiguen mejorar los resultados incorporando las sinergias de los procesos individuales, no son escalables a nivel industrial por su elevado consumo en reactivos muy específicos, así como por su alto coste.

En este sentido, las patentes revisadas muestran cómo se han adecuado los métodos a los procesos industriales con la incorporación y/o sustitución de solventes, así como con la modificación de las condiciones de proceso, como la presión y la temperatura. De este modo se observa que tanto las extracciones en medio básico, con la sustitución del NaOH por KOH, y en medio ácido, con la sustitución del HCl por HNO₃, se utilizan indistintamente para obtener elevados rendimientos de extracción. Por otro lado, para la reducción de los tiempos, se observa, como en gran parte de las patentes, los procesos son llevados a cabo a temperaturas superiores a los 100°C, lo que incrementa la cinética de extracción.

El análisis de los métodos de extracción, así como de las patentes, han permitido identificar las variables más importantes a tener en cuenta para poder desarrollar el proceso de extracción, manteniendo rendimientos de extracción mayores del 80 % con un tiempo de extracción mínimo sin tener demasiado en cuenta la

selectividad, ya que en los procesos industriales predomina el interés en que estos sean viables técnicamente y económicamente.

Con el objeto de superar estas limitaciones, en este trabajo ha desarrollado un método de extracción mejorado, basado en el método con solventes, que permite la conjugación de diferentes tipos de solventes, además de obtener rendimientos y tiempos de extracción aceptables. Para ello se van a evaluar distintos solventes oxidantes, en concreto el ácido nítrico, el dicromato potásico y el peróxido de hidrógeno. Como ya se ha mostrado en las revisiones anteriores, se trata de solventes ampliamente utilizados que permiten reducir los tiempos de extracción manteniendo unos rendimientos altos. El uso del ácido nítrico, además, permitiría la adición de nitrógeno al extracto húmico obtenido. Por su parte, el dicromato potásico que es un agente oxidante, también aportaría potasio al fertilizante así obtenido. Finalmente, el peróxido de hidrógeno es un agente oxidante que permite obtener buenos rendimientos y tiempos bajos de extracción con un reducido coste económico. El análisis de las opciones de estos solventes, junto con la adecuación física del material a extraer, han motivado el desarrollo de un proceso factible técnica y económicamente.

Por otro lado, también se ha mostrado la importancia de las condiciones del proceso en el tratamiento del material de partida. Asimismo, se ha llevado a cabo, por tanto, un estudio de optimización de las variables involucradas tanto en los pretratamientos como en el proceso de extracción. Se ha realizado un estudio de las posibles variables más influyentes como el tamaño de partícula, tipo de solvente, etc., en base al estudio del arte realizado en el Capítulo 1 y la experiencia de Fertinagro Biotech en procesos de este tipo, así como la posible influencia de las diferentes longitudes de onda de la radiación emitida por la luz visible. En definitiva, se ha realizado un estudio de los diferentes solventes y el efecto de las variables influyentes, para de este modo obtener un nuevo proceso de extracción.

En la siguiente figura se muestra el diagrama de bloques que representa el proceso propuesto para la extracción de sustancias húmicas.



Figura 16. Diagrama de bloques para la extracción de sustancias húmicas

Por último, y de gran relevancia en el trabajo desarrollado en esta Tesis, aprovechando la capacidad de quelatación/complejación de las sustancias húmicas, y los efectos positivos en cuanto a ser utilizadas como correctores de carencias con micronutrientes en su aplicación como fertilizantes, se ha desarrollado un proceso de activación de las sustancias húmicas, aumentando su capacidad de complejación de metales, lo que supone una aportación totalmente novedosa en este campo de estudio. De esta manera se obtiene un fertilizante complejo que puede ser empleado en agricultura ecológica, frente a los quelatos sintéticos cuyo uso está limitado o contraindicado, es más, la perspectiva actual apunta a que se van a ir eliminando a medida que surjan alternativas eficientes.

Para llevar a cabo esta parte de trabajo se procedió a la evaluación de la capacidad de complejación de micronutrientes como el hierro, cinc y manganeso en fertilizantes en base a sustancias húmicas. Estos micronutrientes son adicionados en la última parte del proceso de activación donde las sustancias húmicas han sido potenciadas para ese fin.

Finalmente, también se destaca la incorporación de diferentes tecnologías como los ultrasonidos y la aplicación de luz con diferentes longitudes de onda. En primer lugar, con la tecnología de ultrasonidos el objetivo es lograr una reducción de tamaño de partícula. En segundo lugar, con la aplicación de diferentes longitudes de onda a través de la luz visible se pretende evaluar una posible potenciación de los radicales con capacidad de complejación.

El proceso de activación de las sustancias húmicas constituye una actividad novedosa ya que, aunque se conocían ampliamente las capacidades de complejación de las sustancias húmicas, hasta la fecha, y según el conocimiento del autor de esta Tesis, no se habían planteado procesos de modificación química de las mismas con la finalidad de aumentar dichas capacidades. Para acometer el objetivo de la activación de las sustancias húmicas y poder modificar su capacidad de complejación, el procedimiento que se plantea es el mostrado en la siguiente figura como diagrama de bloques.

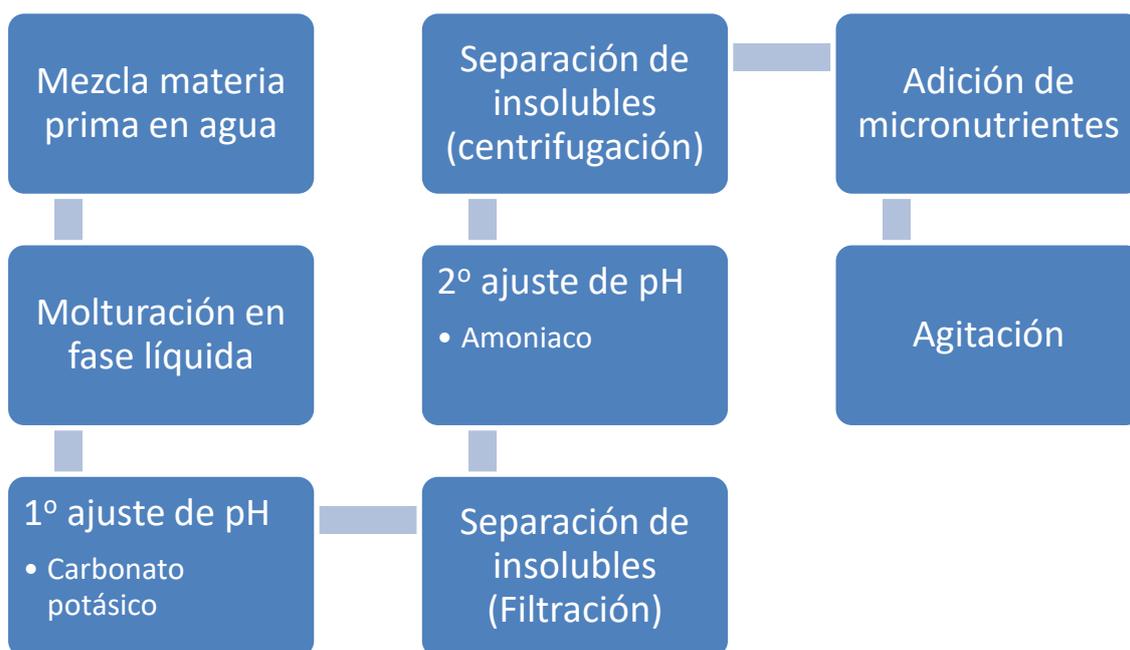


Figura 17. Diagrama de bloques de la activación de las sustancias húmicas.

2.1.- MATERIALES Y REACTIVOS

A continuación, se mostrarán detalladamente tanto los materiales como los equipos de laboratorio empleados para el desarrollo experimental del presente trabajo.

2.1.1.- EQUIPOS DE LABORATORIO

En el trabajo experimental de esta tesis se han utilizado diferentes equipos de laboratorio y planta piloto que permiten simular los procesos que tendrían lugar en una planta industrial.

- Reactor de cristal. Este equipo se utiliza para llevar a cabo las pruebas de extracción de sustancias húmicas y de activación de las sustancias húmicas para aumentar la complejación en las diferentes condiciones testadas en el estudio (Figura 18). Este reactor consta de los siguientes elementos:
 - Placa calefactora JP-Selecta Tectron 3473200.
 - Reactor de cristal de 2 litros de capacidad.
 - Agitador de hélice de laboratorio IKA W20 con controlador del grado de agitación.



Figura 18. Reactor de cristal, con agitador de teflón

- Sonicador. Marca Bransom modelo DCX S20-400, con una frecuencia de 40 kHz y una potencia de hasta 400 watos. Se utiliza para llevar a cabo la activación de las sustancias húmicas mediante ultrasonidos.



Figura 19. Sonicador/Ultrasonidos

- Molino en fase líquida. Instrumento modelo EHP 1,5 relleno de bolas de circonita, de 0,18 kW de potencia con una capacidad volumétrica de 4,3 litros. Se emplea para efectuar la molienda de carbón en fase líquida.



Figura 20. Molino fase líquida y bolas de relleno que hay en su interior

- Grindómetro Hegman. Este instrumento sirve para la determinación del grado de finura de molienda. Su rango de medida es de 0 a 100 micras.



Figura 21. Grindómetro

- Tamices de diferentes tamaños de malla. Mediante este sistema se lleva a cabo la primera criba de la leonardita. Para el trabajo realizado se utilizaron los siguientes tamices:
 - 1 tamiz de 10 mm de luz de malla.
 - 1 tamiz de 1 mm de luz de malla.
 - 1 tamiz de 400 μm de luz de malla.
 - 2 tamices de 100 μm de luz de malla.



Figura 22. Tamices utilizados en el desarrollo experimental

- Medidor de clorofila. SPAD-502 de Chlorophyll Meter (Minolta Camera Co., Osaka, Japón). Este equipo cuantifica, de manera directa, el contenido de clorofila existente en la hoja de una planta. Se ha utilizado para medir el contenido de clorofila en las hojas en el experimento en campo.



Figura 23. Medidor de clorofila

- Espectrofotómetro. Perkin Elmer. Lambda 25. Este equipo (Figura 24), tiene un rango de longitud de onda de 200 nm hasta 1100 nm. Se ha utilizado para medir diferentes parámetros químicos, por ejemplo, el fósforo soluble del suelo en los ensayos de campo.



Figura 24. Espectrofotómetro

- ICP-OES. Varian. Espectrómetro de emisión atómica en plasma de acoplamiento inductivo (Figura 25). Este equipo se ha utilizado para medir diferentes micronutrientes como el hierro, cinc, manganeso, etc. Estos resultados se utilizan en el método de análisis del porcentaje soluble de micronutrientes del apartado 2.2.3.



Figura 25. Espectrómetro de emisión atómica en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)

- Lámparas led. Se utilizarán para la activación del carbón a diferentes longitudes de onda.



Figura 26. Lámparas led

- Láminas a diferentes longitudes de onda. Estas láminas se utilizan para recubrir las lámparas led y poder aplicar diferentes longitudes de onda.



Figura 27. Láminas con diferentes filtros de longitudes de onda

2.1.2.- REACTIVOS DE LABORATORIO.

A continuación, se detalla el material de laboratorio utilizado para los procedimientos descritos en los apartados 2.2.1, 2.2.2 y 2.2.3.

- Balanza analítica. Mettler Toledo. De 0,0001 gramos hasta 180 gramos.
- Centrifuga Mixtasel de Selecta. Con rango de velocidad de 200 rpm hasta 2500 rpm
- Estufa con regulación de temperatura a 100-130 °C Selecta.
- Agitador magnético de Selecta
- Cubeta de pesado de sustancias con capacidad de 10 mL.
- Vaso de precipitados de 250 y 100 mL.
- Matraz aforado de 250 y 100 mL.
- Pipetas de 25 y 10 mL.
- Bureta de 50 mL.
- Vaso Erlenmeyer de 250 mL.
- Embudo de caña larga.
- Papel de filtro FC20M cualitativo 185 mm de filtración rápida.
- Papel de filtro FC20M cuantitativo 185 mm de filtración rápida.
- Varillas agitadoras.
- pH metro. Crimson SENSION+ pH1 DL. Rango de pH 2,00–19,99.
- 25 kg de carbón/leonardita de la zona de las cuencas mineras en Utrillas.
- 25 kg de leonardita de procedencia China.
- 25 kg de leonardita de procedencia canadiense.
- 25 kg de quelato comercial Libfer® SP – BASF.
- Ácido fosfórico 85%.
- Ferroína.
- Sal de Mohr 0,5 N.
- Ácido sulfúrico concentrado del 98 % y diluido al 25 %.
- Hidróxido sódico 0,5 N.
- Amonio hierro (II) sulfato 6-hidrato.
- Pirofosfato tetrasódico 10-hidrato.
- Hidróxido sódico.
- Peróxido de hidrogeno de 110 volúmenes (30 %).
- Ácido nítrico de 98 %.
- Dicromato potásico.
- Ácido clorhídrico 0,5 M.
- Solución de cloruro de lantano.
- Solución patrón de hierro de 1000 ppm.
- Solución patrón de cinc de 1000 ppm.
- Solución patrón de manganeso de 1000 ppm.

2.2.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

2.2.1.- ANÁLISIS DEL RENDIMIENTO EN EL PROCESO DE EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS

Para el análisis de la eficacia del proceso, se utiliza el método analítico planteado por Kononova *et. al.* (170), que es un método alcalino que emplea dicromato potásico para la extracción primaria y ácido sulfúrico para la secundaria. Dicho método es el procedimiento oficial utilizado para el análisis de fertilizantes según R.D. 1110/1991 (B.O.E. nº 170 de 17 de julio de 1991) para abonos orgánicos y órgano-minerales. Inicialmente, las muestras se someten a una extracción alcalina para obtener el extracto húmico total. Posteriormente, se analiza la cantidad de ácidos húmicos presentes en el extracto, precipitándolos mediante la acidificación de la muestra a un pH inferior a 1. No es necesaria una extracción alcalina si la muestra es líquida, ya que se encuentra en forma soluble.

Protocolo de análisis

A.- Extracción.

Muestras sólidas:

- I. Pesar aproximadamente de 1 a 1,5 g de muestra previamente secada a 50-60 °C durante 48 horas con precisión de 1E-4 gr.
- II. Introducir la muestra en un vaso de precipitados y añadir 100 mL de solución extractante recientemente preparada. Agitar durante una hora. A continuación, centrifugar a 1600 rpm durante una hora.
- III. Poner el líquido sobrenadante de la centrifugación en un matraz de 1 L y enrasar con agua destilada.

Muestras líquidas:

- I. Pesar aproximadamente 3 g de muestra (si se supone que el contenido en extracto húmico es superior al 25% EHT) o 3,5 g (si el contenido que se espera es inferior al 16% de EHT, en cambio si el contenido se encuentra entre ambos porcentajes puede tomarse cualquiera de las dos cantidades) previamente preparada con precisión de 1E-4 gr.
- II. Trasferir a un matraz aforado de 1000 mL, lavando bien el pesa sustancias con agua. Ajustar hasta enrase.

B.-Determinación del extracto húmico total.

- I. Tomar una alícuota de 50 mL del punto III de las muestras sólidas y punto II de las muestras líquidas, anteriores y pasarlas a un matraz Erlenmeyer perfectamente limpio y seco. Introducirlo en la estufa a 150 °C hasta sequedad.
- II. Una vez seca la muestra, dejar enfriar y añadir 10 mL de dicromato potásico 1 N y 20 mL de ácido sulfúrico concentrado, agitando suavemente durante un minuto. Dejar reposar durante 30 minutos (tiempo de oxidación).
- III. Transcurrido este tiempo, añadir hasta un volumen aproximado de 70 mL de agua destilada. Dejar enfriar hasta temperatura ambiente.
- IV. Añadir 1,5 mL de ferroína y valorar la solución con sal de Mohr 0,5 N hasta viraje de verde esmeralda a rojizo salmón. Realizar una prueba en blanco.

Para conocer el valor de extracto húmico se realizan los siguientes cálculos:

Se calcula en primer lugar el porcentaje de carbono (% C) según la ec. 1.

$$\% C = \frac{(V - V') \cdot N \cdot f \cdot 0,39}{Pm \cdot 0,05} \cdot 100 \quad (1)$$

donde 0,39 y 0,05 son factores de corrección en función de las diluciones y pesos tomados. El valor del porcentaje de extracto húmico se calcula a partir del valor obtenido de %C mediante la ec. 2.

$$\% E.H = \% C \cdot 1,724 \quad (2)$$

donde 1,724 es un factor empírico propuesto por Walkley (1947), que expresa la relación entre el porcentaje de carbono y el porcentaje de extracto húmico (normalmente 1,724, si bien en suelos forestales u orgánicos se suele aplicar el factor 2).

- V=Volumen en mL gastado de sal de Mohr en el blanco.
- V'=Volumen en mL gastado de sal de Mohr en la muestra.
- N = Normalidad (equivalentes-gramo)
- F = factor adimensional de la sal de Mohr.
- Pm = peso de muestra, en gramos.

2.2.2.- ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE COMPLEJACIÓN

Este método permite la determinación de la concentración total de cada micronutriente complejado en muestras fertilizantes tras la diferencia del contenido de micronutrientes complejado, pero no identifica los agentes complejantes individuales.

El método es aplicable a fertilizantes CE que contengan micronutrientes complejados amparados por el Reglamento CE 2003/2003, en concreto a fracciones de masa de metales complejados a partir de 0,07 % de hierro, 0,006 % de manganeso y 0,035 % de cinc que está basado en la norma UNE-EN 15962. El método consiste en la precipitación de las formas inorgánicas a pH 9. Así, las formas complejadas de un elemento permanecen en solución y se separan de las formas solubles no unidas (no complejadas). Sus contenidos se determinan por espectrofotometría ICP-OES, así como el contenido en el elemento soluble.

Protocolo de análisis

A.- Preparación de la muestra

- I. Se pesa, con precisión de $1E-4$ gr, una cantidad de fertilizante entre 5 y 10 gr Dependiendo del contenido declarado de metal complejado, se añaden 200 mL o 400 mL de agua en un vaso de precipitados de 250 o 500 mL.
- II. Se homogeneiza la mezcla con un agitador magnético durante 1 hora. Se transfiere la solución cuantitativamente a un matraz aforado de 250 mL o 500 mL. Se enrasa con agua y se homogeneiza.

B.- Precipitación

- I. Se pipetea 20 mL de la solución anteriormente realizada en un vaso de precipitados de 50 mL. Se añaden dos gotas de H_2O_2 , se agita y se sube el pH a 9,0 con NaOH 0,5 mol/L o 0,05 mL/L, tan rápido como sea posible para evitar la reacción con el dióxido de carbono atmosférico. Se cubre el vaso de precipitados.
- II. Se va comprobando el pH y si disminuye de 9, se debe de ir corrigiendo para mantener el valor. Una vez corregido, el vaso de precipitados debe quedar tapado.
- III. Se deja la solución reposar en la oscuridad durante un mínimo de 18 h y un máximo de 24 h. Se reajusta el pH a 9,0, se transfiere la muestra a un matraz aforado de 100 mL y se enrasa con agua. Se filtra la solución a través de un filtro de membrana. Si se observa precipitación y la filtración es dificultosa, las muestras se pueden centrifugar a 7500 rpm entre 20 °C y 25 °C durante 10 minutos antes de la filtración.

Una vez filtrada, para mantener la mezcla estable ésta debe ser acidificada con ácido clorhídrico 6M.

C.- Cálculos

Para la determinación del porcentaje de complejación se aplica la siguiente ecuación (ec. 3):

$$\% \text{ Complejación} = \frac{C_f}{C_i} \times 100 \quad (3)$$

donde:

C_f : es la concentración, en porcentaje en peso, del metal soluble una vez filtrado después de la precipitación.

C_i : es la concentración, en porcentaje en peso, del metal soluble antes de empezar el ensayo.

Ambas concentraciones inicial y final se calculan con el ICP OES, tal y como se ha descrito al inicio del apartado.

2.2.3.- ANÁLISIS DEL PORCENTAJE SOLUBLE DE MICRONUTRIENTES (FE, MN, ZN, CU, ...)

El procedimiento de análisis de micronutrientes solubles consiste en la extracción con agua y determinación de los oligoelementos solubles, hierro, cinc y manganeso, presentes en el fertilizante, suelo o cultivo, para proceder posteriormente a su determinación mediante un equipo de medida, por ejemplo, un espectrofotómetro o un ICP-OES.

Este método es aplicable a fertilizantes CE que contengan micronutrientes en un porcentaje inferior al 10 %, basado en el método descrito en el reglamento (CE) nº 2003/2003 (171).

Protocolo de análisis

A.- Preparación de la muestra

- I. Pesar, aproximadamente, 1 g de muestra y trasvasar a un matraz aforado de 250 mL.
- II. Agregar 200 mL de agua y agitar durante unos 30 minutos como mínimo.
- III. Enrasar con agua destilada, homogeneizar y filtrar sobre un matraz Erlenmeyer.
- IV. Tomar una alícuota de 5 mL del líquido filtrado en un aforado de 100 mL y enrasar con ácido clorhídrico 0,5 M.
- V. Tomar de esta última solución 2 mL en un aforado de 100 mL y añadirle 10 mL de cloruro de lantano. Enrasar con ácido clorhídrico 0,5 M.
- VI. Introducir la muestra en el equipo de medida de concentración (ICP-OES).

B.- Cálculos para determinar el contenido de micronutrientes solubles al agua.

$$\% Fe, Zn, Mn_{sol\ agua} = \frac{L \cdot V_o \cdot F}{P_m \cdot 10.000} \cdot 100 \quad (4)$$

Donde

- L = Concentración en % de la lectura obtenida del equipo de medida (ICP-OES).
- V_o = volumen del matraz inicial en mL.
- F = Factor de dilución adimensional, de las diferentes diluciones realizadas en función de la cantidad de micronutriente existente. Este valor se calcula a partir de los gramos de fertilizante utilizado y la dilución utilizada.
- P_m = peso de la muestra en gramos.
- 10.000 es un factor de dilución de las dos veces que se enrasa en matraz aforado de 100 mL

2.2.4.- ANÁLISIS DEL EFECTO FOTOELÉCTRICO

En 1887, Heinrich Hertz descubrió el efecto fotoeléctrico, según el cual, si una superficie metálica es sometida a la acción de la luz, esta puede desprender electrones, denominados fotoelectrones(172). El trabajo necesario para desprender un electrón de la superficie del metal viene condicionado por la naturaleza del metal y la energía de los enlaces que lo componen. Este trabajo puede cuantificarse con la siguiente ecuación:

$$W_{\theta} = h \times \nu_{\theta} \quad (5)$$

Donde h es la constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34}$ J·s) y ν_o es la frecuencia umbral en Hz.

Para poder cuantificar dicho efecto Albert Einstein llevó a cabo diferentes suposiciones como:

- La energía de cada fotón está cuantizada.

$$E = h \cdot \nu \quad (6)$$

- El electrón que está más débilmente unido, será extraído con mayor energía cinética.

$$E_c = h \cdot \nu - w_\theta \quad (7)$$

Cuando se modifica la intensidad de la luz, se modifica el número de fotones que incide sobre el cátodo por cambiará sustancialmente el número de fotoelectrones emitidos. Sin embargo, una modificación de la intensidad no supondrá una modificación en la energía de los fotoelectrones emitidos. La cantidad de fotoelectrones emitidos afecta directamente a la estructura del metal que es sometido al efecto fotoeléctrico.

2.2.5.- DISEÑO DE EXPERIMENTOS PARA LA ACTIVACIÓN DE EXTRACTOS HÚMICOS

Con la finalidad de estudiar diferentes métodos propuestos para aumentar la capacidad complejante de los extractos húmicos -activación de los extractos húmicos-, se utilizará un diseño experimental factorial, donde se evaluarán los efectos de las diferentes variables que pueden influir en la capacidad de los extractos húmicos complejar hierro, manganeso y cinc.

El diseño experimental consiste en realizar y planificar los experimentos necesarios para conseguir extraer la máxima cantidad de información de los datos recopilados en presencia de ruido, en la menor cantidad de pruebas experimentales. La idea básica del diseño de experimentos es variar todos los factores relevantes en un conjunto de experimentos planificados y luego conectar los resultados mediante un modelo matemático (173).

Cuando se lleva a cabo un estudio experimental para conocer las variables influyentes en un determinado proceso, es necesario responder a preguntas como (173):

- ¿Qué factores tienen una influencia real en las respuestas (resultados)?
- ¿Qué factores tienen interacciones significativas (sinergia o antagonismo)?
- ¿Cuáles son los valores más óptimos de los factores para conseguir las condiciones óptimas para el mejor rendimiento de un proceso, un sistema o un producto?

- ¿Se puede predecir las respuestas (resultados) en base una configuración previa de los factores?

Si se lleva a cabo una correcta configuración del diseño experimental se pueden responder a todas estas preguntas.

La detección es la primera etapa de una investigación en la que el objetivo es identificar los factores importantes. Un factor importante es aquel cuyas variaciones causan cambios sustanciales (efectos) en la respuesta (174). En la etapa de selección, se utilizan modelos simples (lineales o lineales con interacciones) y diseños experimentales que permitan la identificación de los factores con los mayores efectos en la menor cantidad posible de pruebas experimentales. Un diseño experimental factorial permite estudiar el efecto individual y las interacciones de varios factores sobre una o varias respuestas. El diseño factorial de experimentos permite la reducción de tiempo y recursos, obteniendo resultados con una exactitud moderada, a diferencia de los resultados obtenidos con los modelos estadísticos y matemáticos tradicionales. El contraste de los modelos estadísticos y matemáticos, donde para la obtención de resultados se han de ejecutar todos los experimentos, frente a los diseños factoriales, que para la determinación de resultados, es posible la combinación de niveles de los factores y con ello la consecuente reducción de trabajo en la ejecución de experimentos, implicando un ahorro notable en todo lo que rodea al experimento en sí (175, 176).

Para analizar las relaciones entre las variables estudiadas en un experimento a partir de los resultados obtenidos, se pueden emplear el método de regresión lineal múltiple (*Multiple Linear Regression* (MLR)) o el método de regresión de mínimos cuadrados parciales (*Partial Least Squares* (PLS)).

Por ejemplo, con la MLR se trata de ajustar modelos lineales o linealizables entre una variable dependiente y varias independientes. Con este modelo de regresión, los coeficientes se calculan para minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, es decir, a partir de la suma de las desviaciones al cuadrado entre los valores observados y ajustados de cada respuesta. Es importante tener en cuenta que el MLR se ajusta por separado a cada una de las respuestas y, por lo tanto, supone que son independientes. En cambio, cuando se han medido varias respuestas (3 o más), es importante desarrollar un modelo que represente la relación entre todas las respuestas y los factores (PLS). La regresión de mínimos cuadrados parciales puede manejar muchas respuestas simultáneamente, teniendo en cuenta sus covarianzas. En este trabajo se ha empleado el método MLR ya que proporciona una visión general de cómo los distintos factores afectan a las diferentes respuestas (177).

Debido a que el diseño factorial completo a dos niveles implica un número de ejecuciones que varía en potencias de 2, al aumentar el número de factores relevantes, el número de ejecuciones se vuelve prohibitivo porque implica un gran número de experimentos. Como solución a esta problemática, se plantea el uso de diseños factoriales fraccionales, que tienen las grandes ventajas de la reducción considerable del número de experimentos y que en la significación de los efectos se cumple, generalmente, el principio de Pareto. Cuando en las primeras fases de una experimentación, esta contiene un elevado número de factores, se suele cumplir que solo unos pocos son responsables de la mayor parte de variaciones en la respuesta, mientras que la mayor parte de factores son responsables en la respuesta en menor grado. El más utilizado es diseño factorial de dos niveles. El uso de los diseños factoriales fraccionarios y sus variaciones en función de la metodología implica un mayor esfuerzo en la definición de las variables y los factores influyentes. A consecuencia de que estos diseños de experimentos ensalzan la importancia de los términos simples y no tanto de las interacciones, pueden utilizarse como mecanismo objetivo para la selección de factores. Cuando se usan con este objetivo, lo más habitual es que se escojan diseños de resolución III, que es un diseño factorial fraccionado donde ningún efecto principal es confundido entre sí, pero sí en los efectos principales con interacciones entre 2 factores. Como han demostrado diferentes estudios (176, 178), los diseños R_{III} no son suficientes para analizar ampliamente y de forma precisa toda la gama de factores e interacciones que podrían requerirse en un estudio de este tipo. Por todo lo anterior, Plackett-Burman idearon otro tipo de diseños ortogonales basados en los diseños R_{III} , que permitían analizar las interacciones entre factores de una forma más precisa que los diseños R_{III} (179, 180).

Diseño factorial completo de 2 niveles y 3 factores.

Los diseños de resolución III utilizan para construir la matriz de un diseño óptimo 2 niveles y 3 factores y como el número de niveles de todos los factores es 2, es necesario construir una matriz ortogonal $N \times N$ que incluya los valores (+1) y mínimo (-1) y donde N es un múltiplo de 4, esto es:

$$N = 4n \tag{8}$$

Además, el número máximo de factores que pueden incluirse en este diseño es $k = N - 1$. En el caso de este trabajo se han elegido 11 factores, que a continuación se justificarán convenientemente, tal y como se muestra en la tabla 7.

Por tanto, en este trabajo se ha utilizado un diseño factorial fraccional, y dentro de las diferentes opciones, el diseño Plackett-Burman. Los diseños ortogonales de Plackett-Burman solo admiten modelos lineales, es

decir, no pueden estimar ninguna interacción entre dos factores (+, -) cuando comparten la misma columna, al no saber que factor es el responsable del efecto estimado.

Tabla 7. Matriz de diseño Plackett-Burman para N=16

Exp No	ConcIni (%)	TaPar (μm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)
1	+	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+
2	+	+	-+	-	-	+	-	-	+	+	-
3	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
4	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+
5	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-
6	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
7	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	+
8	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
9	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-
10	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-
11	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+
12	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+
13	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+
14	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	+
15	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Para llevar a cabo el diseño de experimentos se ha utilizado el programa informático *Modde* de Unimetrics versión 6.0 de Sartorius Stedim Data Analytics (173). Este software permite realizar el diseño de experimentos factorial de una forma sencilla y la matriz de experimentos se obtiene en función de los factores elegidos y calculando los parámetros estadísticos necesarios.

2.2.5.1.- Factores a estudio

Como se ha mencionado anteriormente, la selección de factores para el diseño de experimentos es muy importante para que los resultados obtenidos puedan cubrir todo el rango de las variables respuesta. En este trabajo se han seleccionado 11 factores que se muestran a continuación (Tabla 8).

Tabla 8. Factores estudiados en el diseño de experimentos

	Nombre	Abreviatura	Unidades	Tipo	Uso	Rango
1	ConcIni	CoIn	%	Quantitative	Controlled	0 to 40
2	TaPar	TaPar	μm	Quantitative	Controlled	10 to 700
3	pH_1	pH_1	-	Quantitative	Controlled	8 to 11
4	pH_2	pH_2	-	Quantitative	Controlled	11 to 14
5	Tie1_Re	Tie1	Horas	Quantitative	Controlled	1 to 48
6	Tie2_Re	Tie2	Horas	Quantitative	Controlled	1 to 48
7	Temp1	Temp1	C	Quantitative	Controlled	15 to 75
8	Temp2	Temp2	C	Quantitative	Controlled	15 to 75
9	ConμMFe	CoFe	%	Quantitative	Controlled	0 to 6
10	ConμMZn	CoZn	%	Quantitative	Controlled	0 to 6
11	ConμMn	CoMn	%	Quantitative	Controlled	0 to 6

Los factores experimentales fueron seleccionados de acuerdo con la experiencia previa alcanzada tras la realización de diferentes pruebas preliminares (datos no mostrados) y tras la revisión bibliográfica, tanto de los métodos de extracción como de las patentes de proceso (163, 165, 167). En la figura 28 se muestran los factores en cada una de las fases del proceso de activación.

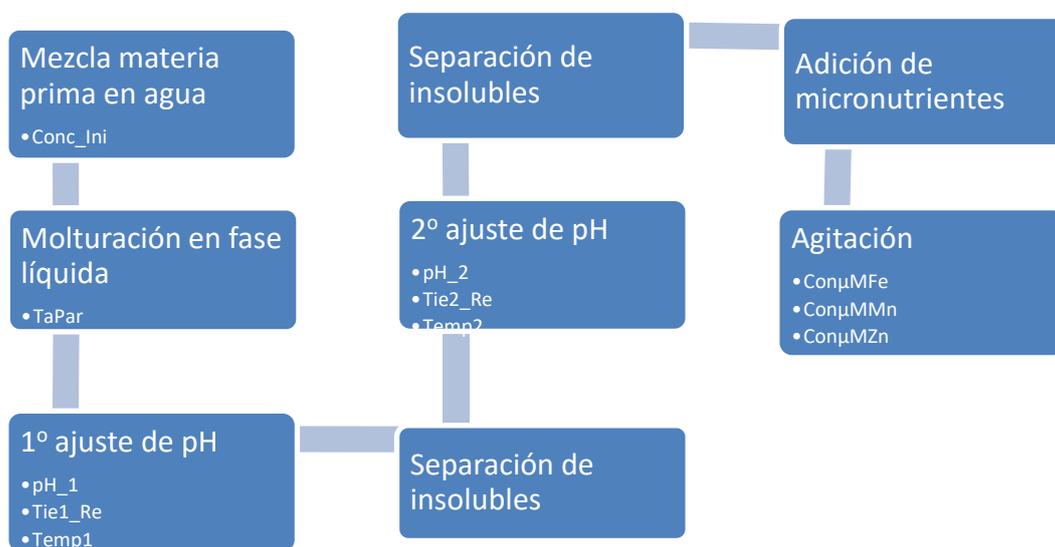


Figura 28. Diagrama de bloques de la activación de sustancias húmicas con los factores asociados

1. **Concentración del extracto a tratar (Conc_Ini).** Es la concentración inicial del extracto (carbón/leonardita) en porcentaje sobre muestra seca. Es una variable en función de su concentración puede tener una mayor o menor influencia sobre los resultados. El rango que se ha estudiado es de 0 % (-1) a 40 % (+1).
2. **Tamaño de partícula (TaPar).** Grado de molturación necesario para aumentar la eficacia de los procesos posteriores. El rango de tamaño de partícula se encuentra limitado por el funcionamiento de los molinos en fase líquida utilizados. El rango de tamaño máximo que se puede introducir en el molino en fase líquida está en torno a 500 μm – 700 μm , y el rango de tamaño obtenido de salida suele encontrarse entre 10-20 μm . Por tanto, el rango que se ha estudiado es de 10 μm (-1) a 700 μm (+1).
3. **pH.** Esta variable es el pH medido tras dos etapas del proceso; esto es, después de la primera molturación y después de la filtración. Por este motivo, en el diseño se han escogido pH_1 (después de molturar) y pH_2 (después de filtrar) como variables. El rango para la variable pH_1 es de 8 (-1) a 11 (+1) y para la variable pH_2 el rango es de 11 (-1) a 14 (+1). El incremento en el pH permite una segunda precipitación selectiva de metales.
4. **Tiempo de extracción-reacción.** La variable expresa la duración en horas requerida para que la extracción-reacción se produzca correctamente. Al igual que en la variable pH, se tienen dos tiempos de extracción. El primer tiempo de extracción se denomina Tie1_Re, el cual va asociado al pH_1, y el Tie2_Re, que va asociado al proceso de activación con pH_2. El rango, tanto para Tie1_Re como para Tie2_Re, es de 1 hora a 48 horas.
5. **Temperatura de reacción.** Esta variable es la temperatura a la cual se han llevado a cabo los procesos de extracción-reacción y está relacionada con los diferentes pH y tiempos de extracción-reacción. Se han definido como variables las temperaturas de los procesos de extracción-reacción Temp1 y Temp2. Para la elección del rango de temperaturas, se han evaluado las condiciones ambientales de temperatura medias a lo largo del año en las instalaciones industriales donde se han llevado a cabo las pruebas, siendo la temperatura promedio de aproximadamente 15 °C. Por otro lado, se han evaluado los efectos de la posible evaporación del agua al trabajar a temperaturas cercanas a los 100 °C, lo que podía provocar resultados superiores en el porcentaje de sustancias complejada, al concentrarse los extractos húmicos activados, por lo que la temperatura máxima del proceso ha sido fijada en 75 °C. Por tanto, el rango de temperaturas se ha fijado entre 15 °C y 75 °C para ambas variables Temp1 y Temp2.

6. **Concentración de micronutrientes.** Esta variable es la que proporciona el valor inicial de cada uno de los micronutrientes utilizados para el análisis de complejación. Este dato es necesario ya que, para el cálculo del porcentaje de complejación de cada uno de los metales según el reglamento de fertilizantes RD 506/2013, es necesario conocer cuál es la concentración soluble del metal en cuestión. Como se han utilizado tres metales diferentes, se les han asignado nombres diferentes. Así, para el hierro el nombre de la variable es $\text{Con}\mu\text{MFe}$, para el cinc $\text{Con}\mu\text{MZn}$ y, por último, para el manganeso $\text{Con}\mu\text{MMn}$. El rango mínimo y máximo elegido para estas variables es del 0 % de concentración de metal hasta un 6 %, respectivamente. El valor de 6 % se ha seleccionado debido a que es el contenido mínimo de metal que debe de contener un fertilizante de forma complejada para poder ser comercializado como fertilizante especial, según el Reglamento CE 2019/1009.

En el software empleado en este trabajo también se definen las respuestas. Para la medida de las variables respuesta se utiliza la medida de la activación y se comprobará con la capacidad de complejación de los tres metales a estudio en este trabajo, que son el hierro, cinc y manganeso. Las variables respuesta corresponden al porcentaje de complejación de cada micronutriente, en base al método explicado en el apartado 2.2.2 (Tabla 9).

Tabla 9. Respuestas descritas para el estudio de activación.

Nombre	Abreviatura	Unidades
CompFe	ComFe	%
CompZn	ComZn	%
CompMn	ComMn	%

En las tablas 10 y 11 se muestran, a modo de ejemplo, la matriz ortogonal y el diseño de los experimentos a seguir que genera el programa en base a los factores antes descritos.

Tabla 10. Matriz ortogonal de valores +1 y -1, del presente trabajo

Nº. Exp.	ConcIni (%)	TaPar (µm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)
1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1
2	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1
3	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1
4	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1	1
5	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1	-1
7	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1	1
8	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1	-1
9	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1	-1
10	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1	-1
11	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1	1
12	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1	1
13	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1	1
14	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1	1
15	-1	-1	-1	1	-1	-1	1	1	-1	1	-1
16	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1

Tabla 11. Tabla de experimentos realizados en este trabajo.

Nº. Exp.	Nombre Exp.	Orden de ejecución	ConcIni (%)	TaPar (µm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)
1	N1	6	40	10	8	11	48	1	15	75	6	0	6
2	N2	17	40	700	8	11	1	48	15	15	6	6	0
3	N3	15	40	700	11	11	1	1	75	15	0	6	6
4	N4	19	40	700	11	14	1	1	15	75	0	0	6
5	N5	11	10	700	11	14	48	1	15	15	6	0	0
6	N6	16	40	10	11	14	48	48	15	15	0	6	0
7	N7	18	10	700	8	14	48	48	75	15	0	0	6
8	N8	12	40	10	11	11	48	48	75	75	0	0	0
9	N9	8	40	700	8	14	1	48	75	75	6	0	0
10	N10	5	10	700	11	11	48	1	75	75	6	6	0
11	N11	4	10	10	11	14	1	48	15	75	6	6	6
12	N12	9	40	10	8	14	48	1	75	15	6	6	6
13	N13	20	10	700	8	11	48	48	15	75	0	6	6
14	N14	13	10	10	11	11	1	48	75	15	6	0	6
15	N15	10	10	10	8	14	1	1	75	75	0	6	0
16	N16	1	10	10	8	11	1	1	15	15	0	0	0

Tal y como se ha mencionado previamente, se ha utilizado el diseño Plackett-Burman, en el cual el número de experimentos es un múltiplo de 4 (ec. 6). Una vez seleccionado el diseño, el software genera automáticamente una matriz con 16 experimentos. En la tabla 10 se muestra cómo queda la matriz de experimentos del presente trabajo.

Una vez descrita la parte experimental, se lleva a cabo la discusión de los resultados obtenidos con el software Modde. Para el análisis de resultados se utilizan diferentes tipos de herramientas estadísticas, tales como el análisis de residuales, el test Anova y los gráficos de influencia entre variables. Aunque el método Plackett-Burman no va a proporcionar una modelización detallada por generar una regresión lineal sin interacciones entre factores, se va a utilizar como método de cribado previo para conocer cuáles son los factores más influyentes y los rangos aproximados de variación de las variables respuesta. A continuación, se describen

brevemente las técnicas estadísticas utilizadas para evaluar los resultados, si bien no se profundiza en ellas al ser herramientas suficientemente conocidas y no ser el objetivo de esta tesis.

Una vez identificados los factores, las variables respuesta y llevado a cabo el cuadro de experimentos mostrado en la tabla 10, se procede al análisis de los resultados (Capítulo 3), para así de ese modo evaluar la bondad del ajuste de regresión lineal. Para ello se utiliza el test estadístico Anova, el cual permite además de evaluar la utilidad, es decir, la significancia del modelo, como se usa en este trabajo de Tesis, también permite responder a la hipótesis inicial con un determinado nivel de confianza. Los análisis Anova valoran la importancia de uno o más factores, para lo que se comparan las medias de las variables respuesta en los diferentes niveles de los factores. La suposición nula constituye que todas las medias de los factores son iguales mientras que la hipótesis alternativa establece que al menos una es diferente. Para poder realizar esta técnica estadística, se debe de tener una variable respuesta continua y por lo menos un factor con dos o más niveles.

2.2.5.2.- Regresión lineal múltiple

El objeto básico de la regresión lineal múltiple consiste en especificar y estimar un modelo de relación entre la variable respuesta y las variables dependientes, también llamadas explicativas o regresoras en unos determinados rangos. En su forma más general, el modelo puede representarse como:

$$Y = f(X_1, X_2, X_3, \dots, X_k) \quad (9)$$

donde Y es la variable cuyo comportamiento se pretende explicar, y $X_1; X_2; \dots; X_k$ son las distintas variables que se suponen potencialmente relevantes como factores explicativos de la variable Y. Debido al tipo de diseño de experimentos utilizado (Plackett-Burman), el estudio se va a limitar al modelo de regresión lineal múltiple sin interacciones entre variables, es decir, del tipo:

$$Y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_3 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon \quad (10)$$

en el que los parámetros β_i transmiten los efectos inducidos por los valores de las variables X_i sobre la variable Y, que se pretende explicar, y ε sería el vector de errores o residuos. La estimación de tales relaciones se efectúa a partir de la información muestral de los valores de Y, X_1, X_2, \dots, X_k , y trata de cuantificar la magnitud de su dependencia. Los parámetros β_i son los coeficientes de la regresión.

El objetivo por tanto es la estimación de los parámetros o coeficientes del modelo (lo que comúnmente se denomina ajuste del modelo). El proceso de ajuste no sólo determina los coeficientes del modelo, sino que también evalúa la bondad del ajuste y establece intervalos de confianza para los coeficientes. La metodología se basa en técnicas estadísticas suficientemente conocidas como los test de contraste de hipótesis y el análisis de varianza (ANOVA).

Los coeficientes de la regresión se suelen determinar mediante el método de mínimos cuadrados (181), que asume que los errores ε_i están normalmente distribuidos (con media 0 y varianza σ^2). El método calcula los coeficientes para minimizar la suma de los cuadrados de los errores. Dada la ecuación del modelo en términos de las observaciones:

$$y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{i1} + \beta_2 x_{i2} + \dots + \beta_k x_{ik} + \varepsilon_i \quad (11)$$

que de forma abreviada es:

$$y_i = \beta_0 + \sum_{j=1}^k \beta_j x_{ij} + \varepsilon_i \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (12)$$

La función a minimizar, con respecto a los coeficientes $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_k$ es la siguiente (182):

$$L = \sum_{i=1}^n \varepsilon_i^2 = \sum_{i=1}^n \left(y_i - \beta_0 - \sum_{j=1}^k \beta_j x_{ij} \right)^2 \quad (13)$$

Por lo que los estimadores de los coeficientes de la regresión, esto es, los $\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_k$, para minimizar la suma de los cuadrados de los residuos, deben satisfacer las siguientes ecuaciones:

$$\left. \frac{\partial L}{\partial \beta_0} \right|_{\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_k} = -2 \sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{\beta}_0 - \sum_{j=1}^k \hat{\beta}_j x_{ij} \right) = 0 \quad (14)$$

$$\left. \frac{\partial L}{\partial \beta_j} \right|_{\hat{\beta}_0, \hat{\beta}_1, \dots, \hat{\beta}_k} = -2 \sum_{i=1}^n \left(y_i - \hat{\beta}_0 - \sum_{j=1}^k \hat{\beta}_j x_{ij} \right) x_{ij} = 0 \quad j = 1, 2, \dots, k \quad (15)$$

Con estas relaciones se tiene un sistema lineal de $p=k+1$ ecuaciones, una para cada uno de los coeficientes de la regresión (k coeficientes más el término independiente). Una vez resuelto el sistema se obtienen los valores de los coeficientes. Por tanto, el modelo ajustado toma la forma siguiente, en notación escalar:

$$\hat{y}_i = \hat{\beta}_0 + \sum_{j=1}^k \hat{\beta}_j x_{ij} \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (16)$$

La diferencia entre la respuesta observada y_i y la predicha por el modelo \hat{y}_i es el residuo, e_i (183).

$$e_i = y_i - \hat{y}_i = y_i - \left(\hat{\beta}_0 + \sum_{j=1}^k \hat{\beta}_j x_{ij} \right) \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (17)$$

En muchos casos se necesita estimar la varianza de los errores, σ^2 . Para obtener un estimador de este parámetro se emplea la suma de los cuadrados de los residuos, SS_{RES} , cuyo valor se obtiene, a partir de la ecuación anterior, como:

Se puede demostrar que el cociente entre la suma de los cuadrados de los residuos y sus grados de libertad es un estimador no sesgado de la varianza de los errores del modelo, razón por la que se utiliza usualmente para estimar la variabilidad de los errores del modelo.

$$\hat{\sigma}^2 = S_R^2 = \frac{SS_{RES}}{n - p} \quad (18)$$

Donde p es el número de términos del modelo (k factores más el término independiente).

2.2.5.3.- Análisis de varianza (ANOVA)

El análisis de varianza de un factor (ANOVA) es una técnica de análisis estadístico que, en su forma más general, permite encontrar si los diferentes grupos o niveles de una variable independiente x tienen diferentes efectos en la respuesta de una variable y . El análisis de varianza evalúa la distribución de la variabilidad total de los datos con respecto a la media global realizando una partición en dos componentes:

- Variación entre la media de los datos en cada nivel y la media global (variación entre niveles o grupos).
- Variación entre las observaciones y la media para cada nivel (variación dentro del nivel).

Dado un estudio experimental con n observaciones procedentes de un factor en a niveles o grupos, siendo N el número total de observaciones ($N = n \cdot a$), la variabilidad total de los datos, SS_{TOT} , expresada como la suma total de los cuadrados de las desviaciones de las observaciones con respecto a la media global, se puede dividir en dos componentes. La primera de ellas (SS_{NIV}) expresa, en forma de suma de cuadrados, las diferencias entre la media de los datos en cada nivel o grupo y la media global, es decir, la variación entre niveles. La segunda componente, SS_{RES} , expresa las diferencias entre las observaciones y la media para cada nivel, la cual suele deberse a errores o residuos (182).

$$SS_{TOT} = SS_{NIV} + SS_{RES} \tag{19}$$

de tal forma que

$$SS_{TOT} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2 \tag{20}$$

$$SS_{NIV} = n \sum_{i=1}^a (\bar{y}_{i.} - \bar{y}_{..})^2 \tag{21}$$

$$SS_{RES} = \sum_{i=1}^a \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{i.})^2 \tag{22}$$

donde

- y_{ij} es el valor de la observación de nivel i para el factor j ,
- $\bar{y}_{..}$ es la media global de las observaciones, y,
- $\bar{y}_{i.}$ es el promedio de dichas observaciones en cada nivel.

Debido a que hay N observaciones, SS_{TOT} posee $DF_{TOT}=N-1$ grados de libertad. Como hay a niveles o grupos, SS_{NIV} tiene $DF_{NIV}=a-1$ grados de libertad. Finalmente, DF_{RES} son los grados de libertad para la suma de las desviaciones debidas al error, SS_{RES} , donde $DF_{RES}=N-a$.

El cociente $SS_{RES}/(N-a)$ es un estimador de la varianza dentro de cada uno de los niveles, mientras que el cociente $SS_{NIV}/(a-1)$ es un estimador de la varianza de los promedios de los niveles, σ^2/n . La variable $SS_{NIV}/(a-1)$ es un estimador de la varianza global (σ^2) si no hay diferencias entre las medias de los niveles (182). A los cocientes anteriores se les denomina medias cuadráticas (MS, Mean Squares). Al valor $SS_{RES}/(N-a)$ se le denomina media cuadrática del error, o también error cuadrático medio (MSE, Mean Squared Error). Las medias cuadráticas son estimadores de las varianzas, y sus respectivas raíces cuadradas, estimadores de las desviaciones estándar de las observaciones.

El análisis de varianza (ANOVA) sirve para comparar la variación entre niveles con respecto a la variación dentro de los niveles. Si el cociente entre las variaciones dentro de los niveles es mucho mayor que las variaciones entre niveles, entonces se puede concluir que las medias de los niveles son significativamente diferentes entre sí. Esto se puede medir mediante el uso del estadístico F, el cual se calcula como el cociente entre la media cuadrática de los niveles o grupos (MS_{NIV}) y la media cuadrática de los residuos (MS_{RES}).

El valor de p (nivel de significancia) es la probabilidad de que la función F de Fisher con (a-1, N-a) grados de libertad sea mayor que F. Esta probabilidad se calcula mediante tablas, y el valor de p expresa la significancia (relevancia) de la variabilidad. Cuanto menor es el valor, mayor es su importancia. Alternativamente, se puede fijar un valor de significancia (los valores más comunes son $\alpha=0.01,0.05$) y evaluar el valor de F (a-1, N-a) para que la probabilidad sea α . Si $F > F(a-1, N-a, \alpha)$ entonces la variación entre niveles (entre grupos) sería significativa. El proceso de cálculo del test ANOVA de significancia del factor se muestra en la tabla resumen siguiente (Tabla 12)

Tabla 12. Variables relevantes en el análisis de varianza de una vía (ANOVA)

Fuente de Variación	Suma de cuadrados (SS)	Grados de libertad (DF)	Media cuadrática (estimador de la varianza)	F	p=Prob>F
Grupos o niveles	$SS_{NIV} = n \sum_{i=1}^r (\bar{y}_i - \bar{y}_{..})^2$	a-1	$MS_{NIV} = \frac{SS_{NIV}}{a-1}$	$F = \frac{MS_{NIV}}{MS_{RES}}$	$P(F_{a-1, N-a}) > F$
Residual (error)	$SS_{RES} = SS_{TOT} - SS_{NIV}$	N-a	$MS_{RES} = \frac{SS_{RES}}{N-a}$		
Total	$SS_{TOT} = \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{..})^2$	N-1			

2.2.5.4.- Test de significancia de la regresión (ANOVA)

En modelos de regresión lineal múltiple se utilizan diversas pruebas para evaluar la bondad del ajuste de los parámetros, bajo las hipótesis de normalidad de los residuos y varianza constante (media 0 y varianza σ^2). El

test de significancia de la regresión se utiliza para determinar si existe una relación lineal entre las variables predictoras y la respuesta, en donde la hipótesis nula (H_0) y alternativa (H_1) son las siguientes:

$$\begin{aligned}
 H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_k = 0 \\
 H_1: \beta_j \neq 0 \text{ al menos un } j
 \end{aligned}
 \tag{23}$$

El rechazo de la hipótesis nula necesita que al menos una de las variables regresoras contribuya de manera relevante al modelo. Para la comparación se utiliza el análisis de varianza (ANOVA).

De acuerdo con el anterior apartado, el Test ANOVA aplicado a la regresión lineal múltiple descompone la suma total de los cuadrados de las desviaciones (suma de cuadrados corregida por la media) en dos contribuciones: la primera, debida al modelo de regresión en sí, y la segunda debida a los residuos (183), de forma que:

$$SS_{TOT} = SS_{REG} + SS_{RES}
 \tag{24}$$

$$SS_{TOT} = \left(\sum_{i=1}^n (\hat{y}_i - \bar{y})^2 \right) + \left(\sum_{i=1}^n (y_i - \hat{y}_i)^2 \right) = SS_{REG} + SS_{RES}
 \tag{25}$$

Los grados de libertad se distribuyen de forma similar, ec. 26

:

$$DF_{TOT} = DF_{REG} + DF_{RES}
 \tag{26}$$

En donde el número de grados de libertad de los residuos y del modelo es, respectivamente $n-p$ y p , siendo p el número de términos del modelo. Como p es el número k de factores más el término independiente, $DF_{REG} = k$; $DF_{RES} = n - k - 1$ y $DF_{TOT} = n - 1$.

El test para evaluar la hipótesis nula (H_0) consiste en obtener el valor de F_0 como

$$F_0 = \frac{\frac{SS_{REG}}{k}}{\frac{SS_{RES}}{n-k-1}} = \frac{MS_{REG}}{MS_{RES}}
 \tag{27}$$

La hipótesis nula se rechazaría en el caso de que F_0 fuese mayor que la función de Fisher-Snedecor con k , $n-k-1$ grados de libertad y al nivel de significancia dado por α . El criterio sería similar al visto en el apartado anterior para el caso del Anova de un factor (2.2.4.3).

El coeficiente de determinación de la regresión R^2 se calcula como:

$$R^2 = \frac{SS_{REG}}{SS_{TOT}} = 1 - \frac{SS_{RES}}{SS_{TOT}} \tag{28}$$

El coeficiente R^2 es una medida del grado de reducción en la variabilidad de la variable respuesta obtenida por usar las variables regresoras en el modelo. Sin embargo, un valor elevado de R^2 no indica que el modelo sea aceptable, puesto que se observa que este valor aumenta conforme aumenta el número de variables del modelo. Para evitarlo, a menudo se utiliza el R^2 pero ajustado por los grados de libertad, que no presenta dicho inconveniente:

$$R^2_{adj} = 1 - \frac{SS_{RES}/(n-p)}{SS_{TOT}/(n-1)} = 1 - \left(\frac{n-1}{n-k-1} \right) (1 - R^2) \tag{29}$$

En el caso de que exista una diferencia importante entre los valores de R^2 y R^2_{adj} esto podría significar que se han añadido términos o factores no relevantes al modelo.

La tabla 13 resume el procedimiento :

Tabla 13. Tabla ANOVA para el contraste de hipótesis de la regresión

Fuente de Variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Estimador de la varianza	F
Regresión	$SS_{REG} = \sum_i (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	k	$\frac{SS_{REG}}{k}$	$F = \frac{\frac{SS_{REG}}{k}}{\frac{SS_{RES}}{n-k-1}}$
Residual	$SS_{RES} = \sum_i (y_i - \hat{y}_i)^2$	$n-k-1$	$S^2_R = \frac{SS_{RES}}{n-k-1}$	
Total	$SS_{TOT} = \sum_i (y_i - \bar{y})^2$	$n-1$		

Caso particular: réplicas en experimentos

En el caso de una matriz de experimentos, si existen n_k observaciones duplicadas (réplicas) en un conjunto de k réplicas, la suma de cuadrados de los residuos y los grados de libertad se descomponen a su vez en una parte debido al *error puro* (*pe, pure error*) y una parte debido a la falta de ajuste del modelo (*lof, lack of fit*), es decir:

$$SS_{RES} = SS_{PE} + SS_{LOF} \tag{30}$$

$$DF_{RES} = DF_{PE} + DF_{LOF} = \sum_k (n_k - 1) + \left(n_t - p - \sum_k (n_k - 1) \right) \tag{31}$$

donde p es el número de términos del modelo (incluyendo la constante). La prueba de bondad de ajuste del modelo se realiza mediante una prueba F entre la suma de cuadrados de la falta de ajuste (LOF) y el error puro (PE), de la siguiente manera:

$$F = \frac{SS_{LOF} / DF_{LOF}}{SS_{PE} / DF_{PE}} \tag{32}$$

2.2.5.5.- Contrastes individuales sobre los parámetros e intervalos de confianza

Una vez aceptada la validez de la regresión múltiple se pueden efectuar contrastes individuales para los diferentes parámetros de la regresión. El intervalo de confianza al $100(1-\alpha)\%$ para el parámetro β_i del modelo se calcula de la siguiente forma:

$$IC_{1-\alpha}(\beta_i) = \left(\hat{\beta}_i \pm t_{n-k-1, \alpha/2} \cdot \sqrt{S_R^2 \cdot q_{i+1,i+1}} \right) \tag{33}$$

donde t es la función de Student con $\alpha/2$ y $n-k-1$ grados de libertad y el factor $\sqrt{S_R^2 \cdot q_{i+1,i+1}}$ es el error estándar en la estimación de β_i . El valor $q_{i+1,i+1}$ es el elemento $i+1$ -ésimo de la diagonal de la matriz $(X'X)^{-1}$,

obtenida a partir de la matriz de experimentos (X). El contraste de hipótesis para evaluar la significancia del coeficiente de regresión individual se obtiene a partir de la evaluación de la condición

$$\left| \frac{\hat{\beta}_i}{S_R \sqrt{q_{i+1;i+1}}} \right| > t_{n-k-1; \frac{\alpha}{2}} \tag{34}$$

la cual, en caso de cumplirse significaría que la hipótesis nula ($H_0 : \beta_i = 0$) podría rechazarse y que por tanto el término sería significativo en el modelo.

2.2.5.6.- Diagnósticos de la regresión

Residuales tipificados, estudentizados

En muchos casos el estudio de los residuos puede aportar información útil para evaluar si se cumplen las hipótesis iniciales del modelo de regresión, para lo que se utilizan los residuales escalados.

Los **residuales tipificados** d_i tienen media 0 y aproximadamente varianza 1 y se calculan como el cociente entre el residuo bruto y un estimador de la desviación típica:

$$d_i = \frac{e_i}{\hat{\sigma}} \quad i = 1, 2, \dots, n \tag{35}$$

donde $\hat{\sigma} = \sqrt{MS_{RES}}$ es la desviación estándar de los residuos (SD). En algunos casos los residuos pueden tener desviaciones estándar diferentes. Para esos casos se recomienda utilizar los **residuales estudentizados** que tienen varianza constante igual a 1 independientemente del valor de xi

$$r_i = \frac{e_i}{\sqrt{\hat{\sigma}^2(1 - h_{ii})}} \quad i = 1, 2, \dots, n \tag{36}$$

Donde h_{ii} es el valor iésimo de la matriz H (siendo $H = X(X'X)^{-1}X'$), que es la que convierte los valores Y en los \hat{Y} ($\hat{Y} = HY$). Al valor de r_i también se le denomina residuo internamente estudentizado.

A menudo la varianza de los residuos se estabiliza, en particular para grandes conjuntos de datos. En esos casos la diferencia entre los residuales tipificados o estudentizados es pequeña, y ambos dan información equivalente. Sin embargo, como debido a que un punto con un valor alto de residuo y de h_{ii} puede ser

potencialmente relevante en el ajuste por mínimos cuadrados, por lo general el estudio de los residuos estudentizados es muy recomendable para detectar puntos atípicos o *outliers*.

Coeficiente Q^2

Da un valor aproximado del R^2 de la predicción.

$$Q^2 = 1 - \frac{PRESS}{SS_{TOT}} \quad (37)$$

Donde el valor de PRESS (Prediction Error Sum of Squares) se calcula como

$$PRESS = \sum_{i=1}^n \left(\frac{e_i}{1 - h_{ii}} \right)^2 \quad (38)$$

Residuos eliminados estudentizados

Otra alternativa posible para obtener el residuo estudentizado es mediante un estimador de la varianza calculado mediante la observación i -ésima eliminada, es decir:

$$S_{(i)}^2 = \frac{(n - p)MS_{RES} - e_i^2 / (1 - h_{ii})}{n - p - 1} \quad (39)$$

$$t_i = \frac{e_i}{\sqrt{S_{(i)}^2 (1 - h_{ii})}} \quad i = 1, 2, \dots, n \quad (40)$$

Donde la variable t_i se denomina residuo eliminado estudentizado o externamente estudentizado.

2.2.6.- ESTUDIO DE LA EFICIENCIA AGRONÓMICA DEL PRODUCTO OBTENIDO

En este trabajo se ha desarrollado un fertilizante basado en hierro complejo, cuya eficiencia agronómica en comparación con otros productos comerciales presentes en el mercado fue evaluada, en primer lugar,

mediante experimentos en cámara de cultivo, y, en segundo lugar, en ensayos en campo. En los primeros, las condiciones de ensayo están completamente controladas y se realizó un experimento que combina una fase de incubación de las plantas en cultivo hidropónico y una segunda fase donde las plantas se trasplantan a suelo agrícola en macetas. En los ensayos de eficacia en campo, existe un mayor número de factores que intervienen en el desarrollo del cultivo, por lo que el control sobre las condiciones del ensayo es menor, sin embargo, esta aproximación permite comprobar el comportamiento del nuevo producto en las condiciones de aplicación a las que está destinado.

2.2.5.1.- Ensayos en cámara de cultivo.

Con la finalidad de estudiar el efecto del producto diseñado en este trabajo en la nutrición férrica de las plantas, se llevó a cabo en primer lugar un ensayo combinando cultivo hidropónico y cultivo en maceta con suelo agrícola y utilizando maíz como cultivo modelo de interés agronómico. Se consideró que en este tipo de ensayo se puede estudiar de forma adecuada la bondad de un complejo o quelato para proporcionar un micronutriente al cultivo. Asimismo, la variedad de cultivo empleada (LG 34.90) muestra un crecimiento y desarrollo fisiológico rápidos. La primera fase del experimento consistió en crecer las plantas de maíz en solución hidropónica, puesto que las plantas crecen en presencia de una solución nutritiva de composición conocida y se evita la presencia de suelo agrícola o sustrato, los cuales pueden provocar cambios en las formas químicas del metal y alterar la capacidad de absorción de las raíces.

El procedimiento seguido para la fase de cultivo hidropónico se describe a continuación.

Las semillas se esterilizaron superficialmente realizando un lavado de 5 minutos con etanol al 96%, seguido de 10 minutos en lejía al 5%. A continuación, las semillas se lavaron extensamente y se dejaron hidratar en agua MilliQ estéril durante 4 horas. Para su germinación, las semillas se colocaron en un lecho de papel de filtro humedecido con agua MilliQ estéril. Las semillas se dejaron germinar en oscuridad durante 4 días, tras lo cual se dispusieron las plántulas en bandejas de cultivo hidropónico, sumergiendo las raíces en solución nutritiva Hoagland estándar (Tabla 14). La solución de Hoagland utilizada es la mostrada en la siguiente tabla:

Tabla 14. Solución nutritiva de Hoagland empleada en el cultivo hidropónico.

Solución patrón	ml/l
1 Molar KH_2PO_4	1.0
1 Molar KNO_3	5.0
1 Molar $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5.0
1 Molar $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.0
Solución patrón de micronutrientes	gr/l
H_3BO_3	2.86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.22
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.08
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.02

Después de 15 días de crecimiento, en las que todas las plantas crecieron en las mismas condiciones, estas se transplantaron a macetas con suelo agrícola, que se sometió a diferentes tratamientos para evaluar la eficacia del nuevo fertilizante. En cada bandeja de cultivo hidropónico se crecieron 12 plantas y se destinaron 3 bandejas a cada uno de los 5 tratamientos que se realizaron en maceta. En total, se utilizaron 180 plantas, 36 por cada uno de los 5 tratamientos.

De las 36 plantas crecidas en hidropónico por cada una de las 5 condiciones, se seleccionaron 15 con un desarrollo homogéneo para cada condición. Se plantaron 3 plantas por maceta y se destinaron 5 macetas a cada uno de los 5 tratamientos. En las macetas se colocó 3 kg de suelo procedente de la zona de Utrillas (provincia de Teruel), que previamente a ser utilizado en el ensayo fue secado y tamizado a un tamaño de 2 mm. Las características fisicoquímicas del suelo se detallan en la Tabla 30, en el apartado de Resultados. Todos los análisis químicos realizados están basados en la normativa de análisis de Fertilizantes RD 506/2013.

Las macetas fueron previamente humedecidas hasta capacidad de campo (máxima cantidad de agua admisible por el suelo sin que percole) y recubiertas lateralmente con unas láminas opacas para evitar la posible fotodegradación de los quelatos. Una semana después del transplante, se aplicaron Los 5 tratamientos descritos en el apartado 2.2.5.1.2.

2.2.5.1.1.-Condiciones del cultivo en cámaras.

Las plantas crecieron con una temperatura y fotoperiodo de 25°C y 16 h luz/22°C y 8 h oscuridad y una intensidad lumínica de 4.000 luxes en superficie. La solución nutritiva se reemplazó por solución fresca cada tres días y se mantuvo en todo momento aireada mediante sondas de burbujeo.

2.2.5.1.2.- Tratamientos aplicados y toma de muestras.

El hierro es aplicado a la planta en forma de una solución al 0,5% de quelato/complejo con un 6% de hierro, en una proporción de 2 ml por litro. El nuevo producto basado en hierro complejado con sustancias húmicas fue comparado con el quelato comercial EDDHA (etilendiamino-N,N'-bis ácido-2-hidroxi-fenilacetico) denominado LibFer, el cual es un agente quelante obtenido mediante síntesis química.

- Control de referencia de base del ensayo, sin adición de ningún tipo de corrector de hierro. Tratamiento 1.
- Compuesto quelatado comercial de hierro, LiBFer, con EDDHA como quelante. Tratamiento 2.
- Nuevo fertilizante desarrollado en este trabajo. Tratamiento 3.
- Hierro sin complejar ni quelatar, con la concentración de hierro para obtener los 54 μmol de hierro. Tratamiento 4.
- Mezcla producto 50% quelatado/ 50% complejado. Tratamiento 5

Se realizaron 3 réplicas por tratamiento, obteniéndose un total de quince bandejas (Figura 29) a las cuales se le aplicaron 54 μmoles de agente quelante por maceta.

Se realizaron dos muestreos; el primero a los 13 días de haberse aplicado los tratamientos y el segundo a los 30 días, cuando se cortó la planta. Se lavó el material vegetal y se determinó su peso fresco y su peso seco.



Figura 29. Disposición de los experimentos del ensayo hidropónico

Las concentraciones de hierro en las diferentes partes de la planta fueron medidas mediante un equipo de plasma de acoplamiento inductivo acoplado a un detector óptico (ICP-OES).

Para el análisis de la clorosis en las hojas se utilizó la medida directa en hoja con el equipo SPAD-502 (Figura 24), mediante la evaluación de la concentración de clorofila. El valor de la medida de clorofila en hoja viene expresado en forma de $\mu\text{mol m}^{-2}$.

2.2.5.2.- Ensayos de eficacia en campo

Para poder llevar a cabo los ensayos de eficacia en campo, en primer lugar, se realizó la caracterización del suelo mediante un análisis fisicoquímico. Los principales parámetros analizados y sus métodos asociados se muestran en la tabla 15.

Tabla 15. Parámetros analizados y metodología para el análisis del suelo donde se ha realizado el test

Parámetro	Metodología
pH (extracto 1:2,5)	Electrometría, medida directa
Conductividad 25°C (extracto 1:5)	Conductimetría, medida directa
Nitrógeno total	Destilación Kjeldhal (Método oficial RD 506/2013)
Nitrógeno amoniacal	Fotometría
Materia orgánica	Calcinación (Método oficial RD 506/2013)
Carbono orgánico	Cálculo aritmético en base la M. O
Relación C/N	Cálculo aritmético en base al Carbono orgánico y N _r
Fósforo asimilable	Gravimetría (Método oficial RD 506/2013)
Potasio asimilable	Gravimetría (Método oficial RD 506/2013)
Calcio asimilable	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Magnesio asimilable	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Carbonatos totales	Calcimetría (Método oficial RD 506/2013)
Caliza activa	Valoración redox (Método oficial RD 506/2013)
Capacidad Intercambio Catiónico (C.I.C)	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Potasio cambiante	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Calcio cambiante	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Magnesio cambiante	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Sodio cambiante	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Cobre	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Hierro	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Manganeso	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Cinc	ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)
Porcentaje de sodio intercambiable	Cálculo aritmético
Textura	Aerometría

Esta metodología de análisis ha sido utilizada no solo para el análisis del suelo, sino también para el análisis químico de los parámetros determinados para estudiar el contenido nutricional de las plantas.

Las pruebas fueron realizadas en colaboración con la red comercial que la empresa Fertinagro Biotech dispone en España y se prolongaron hasta el final de la cosecha. En los ensayos previos en cámara de cultivo, el diseño de los tratamientos tiene como objetivo estudiar la viabilidad del nuevo fertilizante para ser

absorbido eficientemente por las plantas y determinar su capacidad para solventar deficiencias de hierro en el medio en que crecen los cultivos. En la fase de ensayos en campo, se redujeron los tratamientos de 5 a 3, simplificando así el diseño experimental y facilitando las tareas de aplicación de los tratamientos y seguimiento de los cultivos, dado que la finalidad en este segundo caso es la de validar el nuevo fertilizante para su aplicación posterior a nivel comercial. Por consiguiente, en los ensayos en campo se realizaron tres tratamientos: 1) tratamiento 1, control sin tratar; 2) tratamiento 2 aplicación del quelato comercial LibFer; y 3) tratamiento 3, aplicación del fertilizante basado en hierro complejado desarrollado en este trabajo.

El cultivo seleccionado para realizar el estudio fue la berenjena, por ser un cultivo exigente en la necesidad de hierro y que, en caso de carencia, muestra claros síntomas, además de tener una rápida respuesta ante la acción correctiva. Asimismo, este cultivo facilita la evaluación de las carencias férricas por tener una elevada masa vegetativa alrededor del fruto. Por último, el ensayo encaja en el periodo de cultivo (agosto 2018 a marzo 2019) en el año en el que se realizó este trabajo, siendo la zona de Almería donde se realiza la prueba.

2.2.5.2.1.- Identificación de las parcelas.

Parcela: Propiedad del Sr. Salvador Escobar Villegas.

Localidad: El Ejido (Almería).

Variedad cultivo: Leticia (berenjena oval negra).

Fecha de trasplante: 18-08-2016

2.2.5.2.2.-Tratamientos aplicados.

Tratamiento T1: Testigo o prueba control.

- Composición testigo de referencia: 0 % de Fe
- Marco de plantación: 0.2 x 0.2 (5.000 plantas/ha)
- Superficie parcela T1: 500 m²
- Parcela T1 : 300 plantas.

Tratamiento T2: Testigo de referencia (producto quelatado comercial con la molécula conocida EDDHA, Libfer)

- Composición testigo de referencia: Fe 6 %, o-o EDDHA 4 %
- Marco de plantación: 2 x 1 (5.000 plantas/ha)
- Superficie parcela T1: 6.200 m²
- Parcela T2 (Testigo de referencia: Libfer): 3.100 plantas.
- Fecha de aplicación: 1,75 Kg/ha mensual a partir del 25 de noviembre
- Dosis: 12 Kg/ha (vía riego).

Tratamiento T3: prueba con el nuevo producto desarrollado en este trabajo basado en hierro complejado con sustancias húmicas.

- Composición del nuevo Fertilizante: hierro complejado de hierro al 6% con sustancias húmicas
- Marco de plantación: 2 x 1 (5.000 plantas/ha)
- Superficie parcela T3: 6.000 m²
- Parcela T3 (Testigo: Nuevo Fertilizante): 3.000 plantas.
- Fecha de aplicación: 1,75 kg/ha mensual a partir del 25 de noviembre
- Dosis: 12 kg/ha (vía riego).

2.2.5.2.3.- Selección del sistema de cultivo y tratamientos.

Para la realización del ensayo se eligieron dos invernaderos diferentes, ya que en cada invernadero el sistema de fertilización es único y de ese modo se evitaba las posibles contaminaciones cruzadas. El tipo de invernadero utilizado para los experimentos es el denominado por su construcción de raspa y amagado, situados uno junto al otro: en uno de ellos se aplicó Nuevo Fertilizante (tratamiento 3) y en el otro el producto comercial Libfer (tratamiento 2) y el control (Tratamiento 1). El suelo era moderadamente básico (8,35 de pH), con una conductividad eléctrica no limitante (0,272 dS/m), muy bajo contenido en materia orgánica (0,7 %), calcáreo y textura franco limosa.

Tras seleccionar la parcela, se procedió a la aplicación del tratamiento 3, a una dosis de 1,75 Kg/ha, por vía radicular y la aplicación del tratamiento 2 a 1,75 kg/ha, también vía radicular. Estas dosis varían según la aplicación sea vía foliar o vía radicular. La diferencia entre ambas dosis radica principalmente en que el fertilizante aplicado vía foliar es aprovechado por la planta de forma más rápida frente al radicular que tiene que ser absorbido por las raíces hasta llegar a la hoja. Durante todo el ciclo de crecimiento, el manejo del cultivo en ambos tratamientos fue idéntico (abonado, riego, tratamientos fitosanitarios y otros).

A lo largo del ciclo de cultivo se llevaron a cabo medidas del contenido en hierro y en otros micronutrientes para evaluar la absorción de los mismos en respuesta a los diferentes tratamientos. Asimismo, se midió el contenido en clorofila de las hojas de las plantas y se determinó el rendimiento final del cultivo. Adicionalmente, a modo informativo, se comentan las impresiones que el agricultor responsable de las parcelas muestra con base en su experiencia acerca de la efectividad de los productos aplicados.

2.2.5.2.4.- Toma de muestras

Se tomaron como muestra de cada parcela elemental 2 líneas y 10 plantas dentro de cada línea de cultivo por repetición (1 repetición en este caso), descartando las primeras plantas de cada fila. Se eligen aquellas líneas ubicadas en el centro de la parcela para disponer de plantas representativas del sector de riego, eliminando así el efecto borde. Se seleccionan, además, plantas homogéneas, sanas y que obedecen a las características medias observadas para el conjunto de todas las plantas del sector, con los siguientes propósitos:

- Determinar el contenido de clorofila (en $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$), la cual es una medida objetiva para la evaluación del contenido en clorofila en la hoja.
Determinar la absorción de hierro (en $\mu\text{g/g}$), parámetro cuya carencia es indicativa de la aparición de la clorosis férrica. (Método ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)).
- Determinar la absorción de micronutrientes (en $\mu\text{g/g}$). Este parámetro evalúa cómo el resto de micronutrientes son asimilados por la planta (Método ICP-OES (Método basado en el oficial RD 506/2013)).
- Contenido en macronutrientes. Se analizaron los niveles de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio y magnesio con los diferentes métodos planteados en la tabla 15.
- Determinar los parámetros de producción (kg/ha). Se obtendrán los rendimientos con el tratamiento de Nuevo Fertilizante, con LibFer y el testigo.

2.2.5.2.5.- Frecuencia en la toma de datos.

Se tomaron una serie de muestras iniciales, antes de la aplicación de los tratamientos, el día 20 de noviembre de 2016) y tras el inicio de las aplicaciones, los días 8 de enero, 24 de febrero, 5 de abril y 10 de mayo de 2017. Se han registrado datos de producción semanalmente (a partir de enero de 2017) coincidiendo con los cortes que viene realizando el agricultor en la finca.

La primera analítica fue realizada 45 días después de la primera aplicación de hierro (08-01-2017) y el resto para seguir la evolución del estado nutricional del cultivo y a nivel foliar de las plantas también fueron realizadas aproximadamente cada 45 días (24-02-2017 / 05-04-2017), a excepción de la última que se llevó a cabo cuando fue recolectado el cultivo (10-05-2017).

De cada planta se tomaron 4 hojas. Se tomó la hoja joven recién formada, que equivale a la quinta o sexta hoja empezando por arriba, incluyendo limbo y peciolo y cada una de las hojas orientadas hacia un punto cardinal. El peso final de la muestra a analizar no sobrepasó los 150 gramos.

En los muestreos se ha tenido en cuenta si la plantación fue tratada con fungicidas que contuvieran productos como “Maneb®” o “Zineb®”, ditiocarbamatos de cinc o manganeso por la posible influencia en los resultados obtenidos, debido a que estas sustancias pueden aportar micronutrientes. Las sales de cobre también pueden distorsionar los resultados si no se consigue descontaminar adecuadamente la muestra en el proceso de lavado previo al análisis.

CAPÍTULO 3

Tal como se ha explicado en el apartado de objetivos, y dado que en el trabajo experimental pueden diferenciarse claramente tres acciones principales para conseguir el objetivo general de esta tesis, los trabajos se van a describir separadamente en tres grandes bloques:

- Estudio de la transformación del carbón/leonardita a sustancias húmicas.
- Estudio de activación de extractos húmicos para aumentar su capacidad de complejación.
- Validación agronómica de un nuevo producto basado en hierro complejado.

3.1.- ESTUDIO DE TRANSFORMACIÓN DEL CARBÓN/LEONARDITA A SUSTANCIAS HÚMICAS.

En el apartado de introducción se han descrito los diferentes métodos de extracción de sustancias húmicas existentes: alcalinos, con resinas, con solventes y mixtos. Además, en el apartado 1.3.6, se han detallado las patentes relacionadas más relevantes aplicadas a nivel industrial. Considerando la revisión estado del arte realizada, en el presente apartado se expone el proceso desarrollado en esta tesis para la transformación del carbón en sustancias húmicas. En dicho proceso se emplea como base el método con solventes, al que se le añade la utilización de diferentes agentes oxidantes que incrementan el rendimiento de extracción.

El diagrama de bloques del proceso desarrollado se muestra en la figura 30:



Figura 30. Diagrama de bloques del proceso desarrollado.

En un primer paso, se realizó la selección de las materias primas más idóneas para el proceso, que fueron el carbón y la leonardita; a continuación, se procedió a un cribado grueso para eliminar la materia prima de un tamaño superior al que el siguiente paso permite, empleando moltración en fase líquida y sonicación. Con

las etapas conjuntas de molidura en fase líquida y sonicación se consiguió la reducción de tamaño de partícula para poder llevar a cabo el último paso del proceso que es la oxidación mediante procesos de radiación y con un agente oxidante.

El desarrollo de estos ensayos se ha realizado mediante la optimización paso a paso de las diferentes fases de la extracción, es decir, se ha tomado unos rangos de operación para cada una de las fases y se ha ido comprobando los rendimientos de extracción (Ecuación 1 y 2) para cada rango seleccionado. Una vez obtenido un resultado que maximiza el porcentaje de EH, este es fijado como valor de referencia en esta fase y se pasa a la siguiente fase, realizando el mismo procedimiento.

Tras la revisión del estado del arte realizada acerca de las variables a controlar en el proceso de transformación del carbón/leonardita en ácidos húmicos, se observó que en las metodologías revisadas solamente se tienen en cuenta variables como el tiempo de oxidación/extracción y temperatura a diferentes pH (163, 165, 167). En este trabajo, como novedad en el proceso, se ha optado por incluir, además, el tamaño de partícula y la aplicación sucesiva de diferentes técnicas de molidura para conseguir el tamaño adecuado, ya que, por ejemplo, el empleo de técnicas como la sonicación puede favorecer la oxidación del material. La influencia de la sonicación en la oxidación del EH se debe al proceso de cavitación potencia la oxidación en presencia del agente oxidante.

Reducción del tamaño de partícula. El proceso engloba las tres primeras fases del diagrama de bloques (Figura 42) antes de llegar a la oxidación. La reducción de tamaño es relevante en la velocidad de reacción de oxidación del carbón con el agente oxidante. La cinética de la reacción se ve favorecida al aumentar la superficie de contacto entre las partículas de carbón molido y el agente oxidante.

El proceso de reducción de tamaño se efectuó en varias etapas, mediante tres equipos diferentes:

- a. Tamizado en fase sólida. En esta fase se lleva a cabo la separación gruesa del material que, debido a su tamaño, no es capaz de ser introducido en las siguientes etapas.
- b. Molino en fase líquida. El objetivo es disminuir el tamaño de partícula del carbón desde un tamaño de 6-2 mm hasta tamaños inferiores a 2 mm.
- c. Sonificador. La finalidad es la reducción posterior del tamaño del material, mediante la aplicación de energía de ultrasonidos sobre el carbón previamente molido, partiendo de tamaños desde 2 mm hasta 10 μm . Cuando el proceso de molidura por ultrasonidos se lleva a cabo en fase húmeda, las partículas de carbón se ven sometidas, además, a fenómenos de cavitación, generándose millones

de burbujas microscópicas que sufren rapidísimos procesos de expansión y colapso que transmiten su energía al material de carbón, haciendo que dicho material sea más poroso y por lo tanto aumente la superficie específica del material, favoreciendo las reacciones sucesivas.

Proceso de oxidación del carbón. Esta es la última fase del proceso de extracción del carbón, la cual culmina en la formación de sustancias húmicas. Para diseñarla se efectuaron pruebas con el solvente elegido, el peróxido de hidrógeno, a diferentes concentraciones, así como un estudio de activación de los ácidos húmicos mediante la aplicación de luz visible a diferentes longitudes de onda, con el objetivo de seleccionar la más favorable. La intensidad o potencia de radiación visible se aplicó en el rango espectral de 395 a 750 nm. Para llevarlo a cabo se utilizaron lámparas led similares a las empleadas en las cámaras de cultivo para simular la radiación solar. Las lámparas se recubrieron con filtros de diferentes transmisividades que tienen la capacidad de filtrar la luz a diferentes longitudes de onda (figura 31), permitiendo la activación de determinados grupos funcionales del carbón, tales como grupos aromáticos y alifáticos, que también están influenciados de forma positiva por la oxidación (185, 186, 187).



Figura 31. Disposición del filtro de color para la prueba a diferentes rangos de longitudes de onda.

El proceso de optimización consistió en un procedimiento secuencial mediante la discriminación de los resultados no válidos en cada etapa y selección del óptimo para la siguiente etapa. Los valores obtenidos en la extracción con diferentes tamaños de partícula de leonardita se consideraron válidos cuando se obtenía

una transformación superior al 60%, siendo este valor un dato obtenido como referencia de un producto comercial (HUMITA 60 de procedencia canadiense).

3.1.1.- PROCESO DE REDUCCIÓN DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA

Para conseguir la disminución de tamaño de partícula, se ha realizado un procesamiento en varias etapas.



Figura 32. Tratamiento para la reducción de tamaño.

En un primer lugar (proceso 1, figura 32), la leonardita se cribó mediante unos tamices circulares para obtener una separación inicial de tamaños superiores a 8mm. Posteriormente, con ayuda de un molino en fase líquida el material se redujo a tamaños inferiores a 2 mm. Por último, se usó un sonicador que permite la aplicación de diferentes frecuencias (energía) para conseguir el tamaño mínimo requerido.

El proceso de cribado en el laboratorio consiste en la adición de cantidades no superiores a 2 kg de leonardita a una vibrotamizadora, en la cual mediante vibración constante se obtiene la leonardita a diferentes tamaños. Se observó que, a tamaños inferiores a 1 mm, las mallas quedaban cegadas por la leonardita y no era efectiva, siendo el principal motivo la humedad proveniente de la propia materia prima. Para solucionar este problema se planteó realizar un secado previo. Tras varias pruebas en laboratorio se decidió descartar este procedimiento por dos motivos: a) en un primer lugar, el secado a nivel industrial no es posible, ya que las condiciones de proceso ya no serían exactamente iguales a las del planteamiento experimental realizado en el laboratorio, y b) el secado mediante calor, debido a la posible combustión para estas sustancias provenientes del carbón. Con todo este proceso se consigue separar el material de un tamaño superior a 8 mm.

Tras esta primera etapa de cribado, el producto se sometió a una molturación en fase líquida (proceso 2, figura 32). Gracias a un molino, que en su interior contiene bolas de zirconio de un tamaño de 0,5 mm, al pasar el producto se reduce el tamaño de partícula por trituración. Posteriormente, el material se sometió al proceso de molturación por ultrasonidos (proceso 3, figura 32). Cabe destacar que la molturación previa a la

reducción por ultrasonidos puede ser llevada a cabo por diferentes tipos de molinos, tanto por vía húmeda o con molinos en vía seca. Los de vía húmeda, como el utilizado en este proceso, tiene la ventaja de que el producto ya queda en una solución acuosa facilitando el proceso posterior de oxidación. Los molinos en vía seca, como pueden ser molinos pendulares, de cuchillas u otros, fueron descartados debido a que, al procesarse carbón dada su alta capacidad de autoignición, se podía generar riesgos de incendio, y el equipamiento con el cual se disponía no cumplía las especificaciones para poder realizar las operaciones con la seguridad pertinente.

El proceso de molturación por ultrasonidos, aunque es efectivo, requiere elevadas potencias, para evitar que el proceso necesite de múltiples repeticiones sobre el mismo material para obtener los resultados deseados. Esta particularidad del equipo de ultrasonidos constituye un hándicap en el escalado a nivel industrial, ya que en la actualidad existen equipos de ultrasonidos de alta potencia, pero no la suficiente para procesos en continuo con el fin propuesto en este trabajo.

Para poder evaluar la eficacia del proceso de reducción de tamaño de partícula de una forma cuantitativa, fue necesario medir las densidades reales y aparentes y determinar la porosidad. La porosidad es una medida de la fracción del volumen de una muestra ocupada por poros internos a su estructura. Su determinación se puede llevar a cabo mediante técnicas avanzadas de porosimetría de helio o de mercurio, o de forma más rutinaria determinando la densidad real y aparente del material. Una vez conocidas ambas densidades, se puede llevar a cabo el cálculo de la porosidad (ε) en porcentaje donde valores inferiores al 5% implican una porosidad pobre y los superiores al 25% una porosidad excelente (188) aplicando la ec. 41:

$$\varepsilon = \frac{\rho_{real} - \rho_{aparente}}{\rho_{real}} \quad (41)$$

3.1.1.1.- Molturación en fase líquida

El objetivo de este proceso, como ya se ha mencionado anteriormente, es la reducción del tamaño del carbón para aumentar su reactividad. El equipo utilizado ha sido un molino de bolas modelo EHP 1,5 de Oliver y Batlle con una potencia de 0,18 kW y con una capacidad de molturación de 5 L/h. La concentración de carbón en agua utilizada fue del 30 % (relación masa de carbón/masa de agua), la cual fue elegida por el rango de operación que admitía el tipo de bombas del que se disponía para poder realizar los trasiegos a través de los diferentes equipos, siendo constante en todos los experimentos llevados a cabo en este trabajo.

Las pruebas fueron realizadas en las siguientes condiciones de proceso:

- Temperatura. La temperatura fue controlada por el propio sistema de molturación, el cual proporciona un control para evitar posibles problemas del producto a molturar. En este caso en particular, la temperatura fue fijada en 25 °C.
- Caudal de alimentación. La velocidad de alimentación para la molturación fue ajustada gradualmente hasta conseguir una molienda estable, variando de 3 L/h a 5 L/h.

La masa de bolas de zirconio en el molino se mantuvo constante en todo el proceso, y fue la recomendada por el fabricante para un correcto funcionamiento del equipo.

- Diámetro nominal de los elementos molturantes: 1,8 mm-2 mm.
- Densidad aparente (bolas secas) kg/litro: 2,56 kg/l.
- Volumen real de bolas, porcentaje en 1 litro: 0,63 %
- Carga de bolas: 2,67 kg-3,33 kg.

La cantidad procesada en el experimento fue de 6,5 litros con una concentración del 30% en carbón, como la velocidad de molienda osciló de 3 L/h a 5 L/h, la duración de cada prueba fue de 90 minutos a 120 minutos.

El número de ensayos realizados en este apartado fue de 44 experimentos. Los resultados se muestran en la tabla siguiente.

Tabla 16. Resultados obtenidos en el proceso de molturación en fase líquida.

Ensayo	Tamaño inicial (mm)	Tamaño final (mm)	Ensayo	Tamaño inicial (mm)	Tamaño final (mm)
1	4,9	1,9	24	4	1,5
2	5,1	1,7	25	4,1	1,9
3	4	1,7	26	4,2	1,6
4	4	1,8	27	4,3	1,9
5	4,3	1,6	28	4,5	1,7
6	4,1	1,6	29	4,9	1,5
7	4,6	1,7	30	4	1,9
8	4	1,6	31	4,2	1,8
9	4,1	1,6	32	4,1	1,6
10	4,2	1,6	33	4,1	1,7
11	4,3	1,6	34	4,1	1,8
12	4,5	1,7	35	4,4	1,6
13	4,6	1,5	36	4,3	1,5
14	4,1	1,6	37	4,4	1,5
15	4,8	1,8	38	4,6	1,7
16	4,2	1,9	39	4,5	1,6
17	4,2	1,6	40	4,7	1,6
18	4,5	1,7	41	4,1	1,5
19	4,3	1,8	42	4	1,4
20	4,4	1,6	43	4,3	1,9
21	4,5	1,6	44	4,5	1,5
22	4,3	1,8			
23	4,6	1,9			

Como resultados promedio de los todos los experimentos realizados se obtuvieron los siguientes valores, donde el intervalo expresa la desviación típica.

- Tamaño medio inicial: $4,34 \pm 0,27$ mm
- Tamaño medio final: $1,7 \pm 0,14$ mm

3.1.1.2.- Molturación con ultrasonidos

La sonicación o ultrasonicación constituye una técnica eficaz para la molienda en húmedo y la pulverización de partículas. Además de utilizarse para procesos de dispersión y desaglomeración, los dispositivos de ultrasonidos se utilizan en la molienda húmeda. Cuando se lleva a cabo una molturación en fase líquida, se produce el mismo efecto que en una cavitación ultrasónica. El efecto de sonicar los líquidos a elevadas potencias de intensidad, provoca en las ondas acústicas variaciones en los ciclos cambiantes de alta presión

(compresión) y baja presión (rarefacción). El proceso tiene diferentes efectos en función del ciclo en el que se encuentra, por ejemplo, en el ciclo de baja presión, las ondas ultrasónicas de alta intensidad crean pequeñas burbujas de vacío en el seno del líquido. Dichas burbujas, cuando alcanzan un determinado volumen en el que ya no son capaces de captar más energía, colapsan de una forma violenta durante un ciclo de alta presión, definiéndose este fenómeno repetitivo “cavitación”. Esta modificación súbita del tamaño de las burbujas genera efectos de microturbulencias y microchorros que pueden llegar hasta 1000 km/h de velocidad de expansión. Con todo esto, el resultado es una elevada aceleración de los procesos de difusión, de transferencia de materia y de las reacciones en fase sólida debido a los cambios en el tamaño del grano y en su estructura (189).

Para comprobar este efecto se aplicaron tratamientos a diferentes potencias de sonicación. El tamaño inicial de partida en estas pruebas de sonicación fue el obtenido en el paso anterior con un valor de tamaño medio de 1,7 mm (Tabla 16).

Tabla 17. Tamaño medio de partícula obtenido aplicando diferentes porcentajes de la potencia nominal (0,4 kW).

Prueba a diferente potencia de sonicación	Tamaño medio final, mm
10%	1,60
20%	1,20
30%	1,00
40%	0,90
50%	0,60
60%	0,40
70%	0,30
80%	0,10
90%	0,04
100%	0,02

En la tabla 17 se presentan los resultados de porosidad conseguidos en función del tratamiento de molturación completo. Dichos resultados se exponen comparándolos con los valores obtenidos para una muestra de carbón sin tratar que solamente ha sido cribada por un tamiz de 8 mm de luz de malla.

Tabla 18. Datos obtenidos del carbón sin ser tratado con la molturación y tratado con la molturación

	Carbón sin tratar	Carbón tratado
Densidad real (kg/m ³)	1,346	1,346
Densidad aparente (kg/m ³)	1,285	0,786
Porosidad (ε) (%)	4,53	41,60

Como puede observarse en la tabla 18, la porosidad y la densidad aparente están inversamente relacionadas, lo que implica que, al descender la densidad aparente, la porosidad aumente 10 veces. De este modo se demuestra que la conjugación de la molturación en vía húmeda y la sonicación permite aumentar la porosidad.

La figura 33 muestra mediante imágenes de microscopía electrónica el efecto del aumento de la porosidad del carbón tratado en las condiciones de molturación en fase líquida (caudal de 5 L/h) y máxima potencia de sonicación.

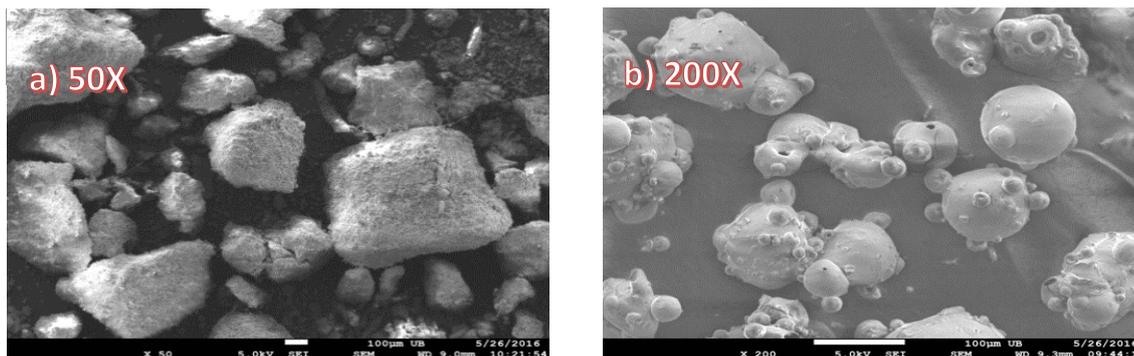


Figura 33. Imagen (a) carbón sin tratar 50X. Imagen b) carbón tratado 200X tras el proceso de molturación en vía húmeda y sonicación.

Se observa también en la figura cómo el tratamiento generó una mayor cantidad de huecos y de partículas pequeñas con una mayor esfericidad, produciéndose a su vez la aglomeración entre esferas pequeñas y esferas de mayor tamaño.

A nivel molecular, el carbón tiene una estructura desordenada debido a la forma en la que se enlazan las diferentes cadenas de carbono, ya sean lineales o aromáticas (190, 191). Cuando el carbón es tratado para su activación mediante los procesos de oxidación, sufre una reorganización y adquiere nuevas propiedades como el aumento de solubilidad y la capacidad de complejación de metales, entre otras (Figura 34).

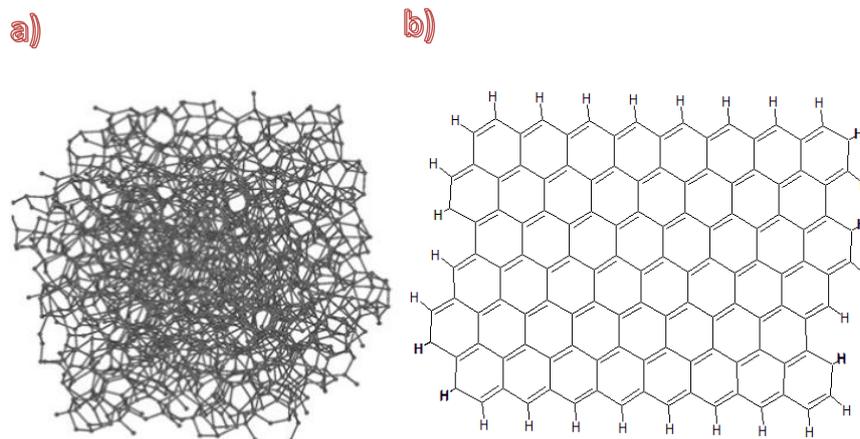


Figura 34. a) Molécula de carbón sin activar. b) Molécula de carbón activada. (192)

Así, la etapa de molturación por sonicación permite obtener un tamaño de partícula adecuado para maximizar su contacto superficial con el oxidante, y a la vez, con el interior de las partículas. Esto se debe a la formación de poros por cavitación, lo que potencia la oxidación del carbón y con ello la extracción de ácidos húmicos a partir de las micropartículas de carbón.

3.1.2.- PROCESO DE OXIDACIÓN DEL CARBÓN

Para llevar a cabo la oxidación del carbón por la vía química, existen diferentes tipos de agentes oxidantes, siendo los más frecuentemente utilizados aquéllos que son capaces de aceptar electrones y por tanto aportar poder reductor. Estos pueden ser el ácido nítrico, el dicromato potásico y el peróxido de hidrogeno. En pruebas preliminares se probaron estos tres agentes oxidantes (datos no mostrados). Los resultados, en el caso del ácido nítrico y el dicromato potásico, aunque aceptables, se desestimaron, si bien en parte por la peligrosidad en su uso, también por las siguientes razones. A nivel industrial, el ácido nítrico produce una reacción exotérmica elevada y su manejo requiere de un conocimiento y trato precavido. Por otro lado, el uso del dicromato potásico está restringido medioambientalmente, ya que en el proceso queda el cromo como residuo y, tanto en la normativa de fertilizantes como en la legislación de tratamientos de agua, el cromo es un metal pesado y los contenidos máximos permitidos son muy bajos o están prohibidos. Por lo anterior, el oxidante seleccionado para este trabajo ha sido el peróxido de hidrógeno, el cual también se emplea ampliamente en el tratamiento de contaminantes de materia orgánica, tales como el incremento de la biodegradabilidad de un efluente, el tratamiento de aguas residuales o la eliminación de compuestos orgánicos específicos (193). El peróxido de hidrógeno actúa como radical oxidante muy potente, debido a la presencia del radical hidroxilo. El mecanismo de la oxidación radicalaria consta de tres etapas: iniciación,

propagación y terminación (194). En la iniciación, la molécula de hidroxilo rompe de forma homolítica generando radicales. En la etapa de propagación se produce la sustitución/reorganización de hidrógenos y de carbono dentro de la molécula. Cuando los reactivos (H_2O_2) se agotan, los radicales que hay en el medio se unen entre sí, produciéndose la etapa de terminación (194).



Figura 35. Proceso de oxidación de una molécula de carbono. Fuente: elaboración propia.

En esta etapa del proceso se lleva a cabo la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo condiciones de temperatura ambiente y presión atmosférica. Además, la reacción es potenciada con la irradiación de luz visible en un rango de longitudes de onda de 380 nm a 730 nm (195, 196).

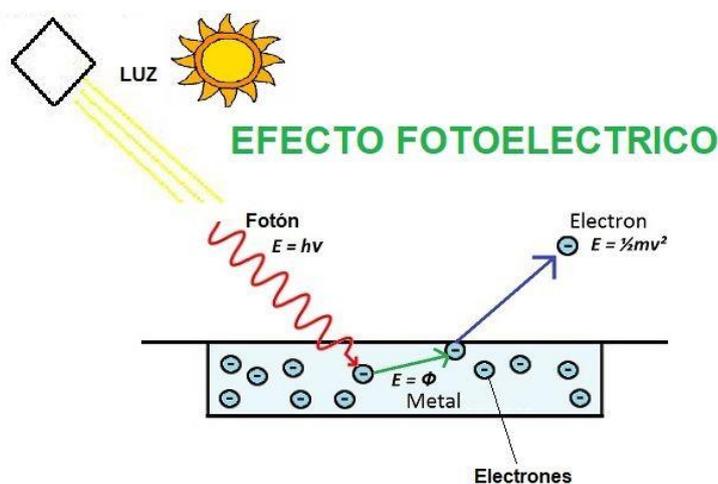


Figura 36. Efecto Fotoeléctrico (197)

Este efecto fotoeléctrico tiene una energía que depende en función de la longitud de onda y de la naturaleza del metal (198, 199).

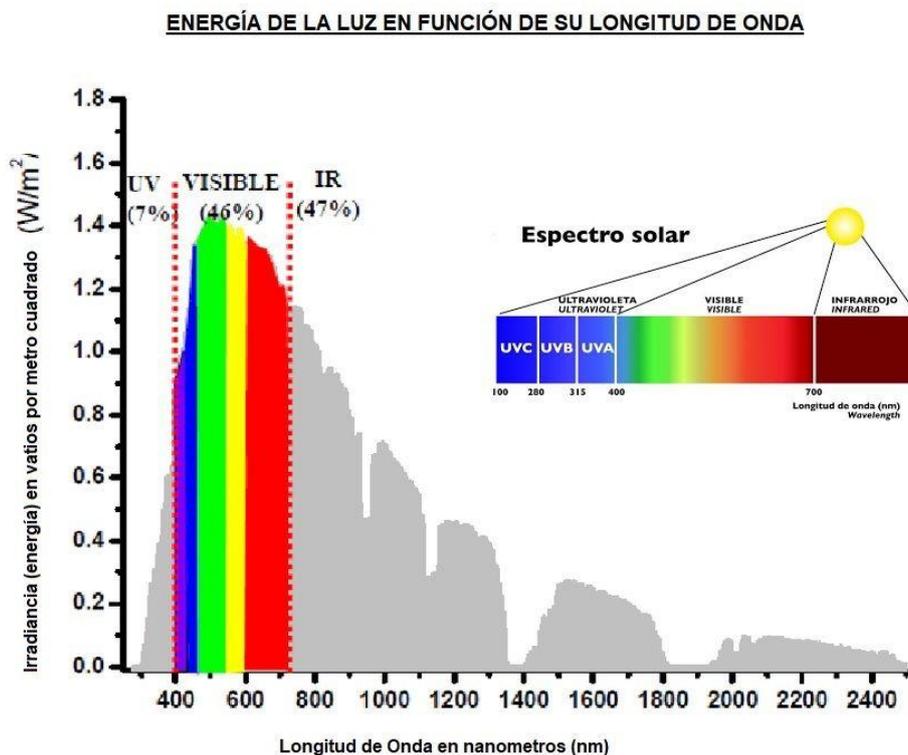


Figura 37. Energía de la luz visible en función de su longitud de onda (198)

Por consiguiente, el efecto fotoeléctrico, con su capacidad de movilizar electrones en función de la longitud de onda emitida, provoca un efecto sinérgico debido a que al salir los electrones del metal estos tienen un efecto resonante que hace que el metal tenga momentos de absorción correspondientes a los valores de la energía del fotón que igualan exactamente a la energía de los electrones en alguna de las capas o subcapas electrónicas. Esto provoca un aumento en la producción de radicales hidroxilos y por tanto del rendimiento de la reacción de oxidación de las partículas soncadas de carbón, lo que lleva a conseguir un mayor rendimiento en la obtención de ácidos húmicos.

Se ha realizado un experimento con tres réplicas, con los diferentes solventes (HNO_3 , $KMnO_4$ y H_2O_2) y con las condiciones de tiempo, temperatura y agitación que se muestran en la tabla 19.

Tabla 19. Condiciones de ensayos en la oxidación química.

Temperatura ($^{\circ}C$)	35
Tiempo (min)	350
Agitación (rpm)	400

Como puede observarse en la tabla 20, el resultado de extracción de sustancias húmicas (% EH) más elevado fue con el ácido nítrico, lo cual viene apoyado por el uso de este ácido en las patentes antes estudiadas (163,

165, 166). Sin embargo, debido a la peligrosidad del uso del ácido nítrico, se decidió utilizar el peróxido de hidrógeno, con el que, aunque su rendimiento fue un 6 % menor, se obtuvo un resultado de extracción aceptable.

Tabla 20. Resultados obtenidos con diferentes oxidantes, HNO₃, KMnO₄ y H₂O₂.

	% Carbón	% Oxidante	%H ₂ O	% EH (R1)	% EH (R2)	% EH (R3)	% EH (Promedio)
HNO ₃	30	20	50	75	73	74	74 ± 1,0
KMnO ₄	30	20	50	61	62	61	61± 0,6
H ₂ O ₂	30	20	50	66	67	67	67± 0,6

Una vez seleccionado el solvente (H₂O₂), se realizó una prueba con diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno (10%, 20%, 30% y 40%). El valor máximo del 40% resulta de efectuar un análisis del precio de las materias primas y determinar el máximo coste admisible en un proceso extrapolable a nivel industrial. El coste del agua oxigenada por litro oscila entre 5,10 €/L y 7,00 €/L, luego si se toma un coste medio de 6 €/L, esto podría suponer hasta 240 €/Tn. De cada una de estas 4 pruebas también se realizaron 3 réplicas.

Tabla 21. Pruebas con diferentes porcentajes de peróxido de hidrógeno.

Prueba	% en masa de Carbón	% en masa de H ₂ O ₂	% en masa de H ₂ O
P1	30	10	60
P2	30	20	50
P3	30	30	40
P4	30	40	30

En la tabla 22 se muestran los resultados del estudio de extracción con diferentes porcentajes de H₂O₂. De esta forma se evaluó la relación de cantidad de agente oxidante frente a porcentaje de extracción.

Tabla 22. Porcentaje de extractos húmicos (EH) obtenidos con diferentes porcentajes de H₂O₂.

Prueba	% en masa de H ₂ O ₂	% en masa de EH (R1)	% en masa de EH (R2)	% en masa de EH (R3)	% en masa de EH (Promedio ± SD)
P1	10	48	53	51	51 ± 2,5
P2	20	66	66	68	67 ± 1,2
P3	30	70	69	69	69 ± 0,6
P4	40	73	71	71	71 ± 1,1

En las tablas 21 y 22 se observa cómo la relación entre concentración y porcentaje de extracto no aumentan proporcionalmente. Con los valores obtenidos se evaluó el óptimo en base a la cantidad de H₂O₂, determinándose que un valor del 20% es, con base en la relación extracto/coste de materias primas, el más adecuado. Por dicho motivo, en los siguientes experimentos se utilizó una concentración de peróxido de hidrógeno del 20%.

No obstante, se estudió la aplicación de radiación de diferentes longitudes de onda para potenciar la oxidación obtenida con peróxido de hidrógeno aplicado en el paso anterior. Para llevar a cabo el experimento se tomaron lámparas led de luz blanca, cubiertas exteriormente con láminas que filtran a diferentes longitudes de onda (de 380 nm hasta 730 nm). Las imágenes mostradas en las figuras 38 y 39 muestran el procedimiento seguido.



Figura 38. Lámparas led utilizadas para la prueba de extracción de sustancias húmicas a diferentes longitudes de onda.

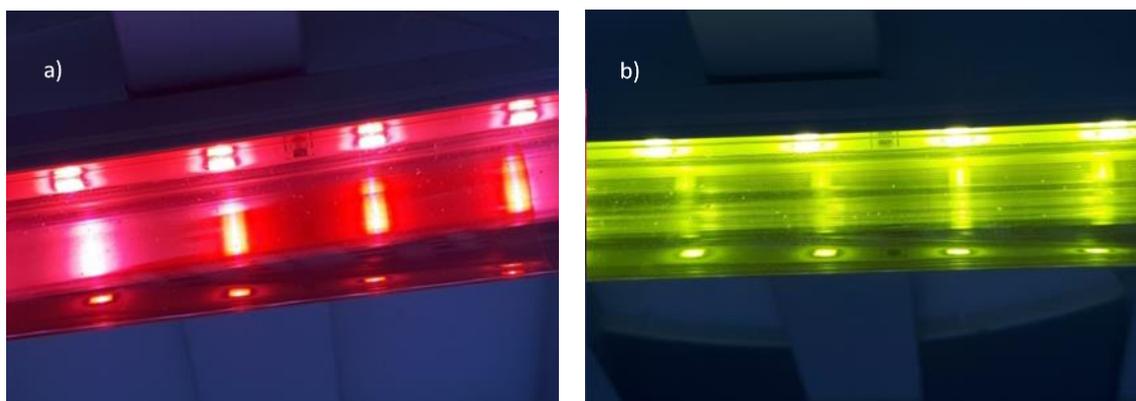


Figura 39. Ejemplo de disposición de las láminas para la radiación a diferentes longitudes de onda a) 620 - 750 nm. b) 495 - 570 nm.

El proceso de aplicación de luz a diferentes longitudes de onda se efectuó colocando el reactor bajo la emisión de la luz el tiempo indicado en la tabla 19.

Por el tipo de filtros que se utilizó, se consideró como base la siguiente tabla de colores y longitudes de onda.

Tabla 23. Referencia de colores con sus longitudes de onda.

Color	Longitud de onda (λ)
Violeta	\approx 380 - 450 nm
Azul	\approx 450 - 495 nm
Verde	\approx 495 - 570 nm
Amarillo	\approx 570 - 590 nm
Naranja	\approx 590 - 620 nm
Rojo	\approx 620 - 750 nm

El rendimiento en la extracción se obtuvo mediante el procedimiento descrito en el apartado 2.2.1 (Tabla 24). Los resultados indican que, cuando se aplican filtros de longitudes de onda concretas, se extrae un mayor porcentaje de ácidos húmicos. Los valores máximos se alcanzan con un rango de longitud de onda entre 500 nm y 590 nm, que corresponde a los filtros de color verde y amarillo. Esto es consecuencia del efecto fotoeléctrico, siendo el rango de longitud de onda 500-590 nm al que mayor energía transmite al carbón, siendo máxima emisión de electrones y la interacción con los radicales oxidantes.

Tabla 24. Resultados de rendimiento de extracción a diferentes longitudes de onda.

Prueba con diferentes rangos de λ	Rendimiento de extracción
380 – 450nm	68%
400 – 430nm	68%
450 - 495 nm	69%
460 - 495 nm	69%
495 - 570 nm	70%
500 - 520 nm	71%
570 - 590 nm	71%
590 - 620 nm	70%
620 - 750 nm	70%
680 - 730 nm	70%

Teniendo en cuenta los principales factores con una mayor influencia en el proceso de extracción de sustancias húmicas a partir del carbón (tamaño de partícula definida a partir del proceso de molturación-sonicación aplicado, elección del agente oxidante y aplicación de luz directa en un rango concreto de

longitudes de onda), se han llevado a cabo un conjunto de ensayos para estudiar el efecto conjunto de estos factores sobre el rendimiento de extracción.

La tabla 25 muestra la diferencia entre las etapas con y sin aplicación conjunta de los procesos anteriormente descritos. Las pruebas realizadas fueron las siguientes:

- Prueba A: aplicación de un tratamiento con ultrasonidos, oxidación con H₂O₂ y sin filtros de luz.
- Prueba B: sin realizar un tratamiento con ultrasonidos, se le aplica oxidación con H₂O₂ y también luz visible entre 380 nm y 730 nm con los diferentes filtros.
- Prueba C: únicamente se realiza un tratamiento con peróxido de hidrógeno.
- Prueba D: se aplican los tres tratamientos consecutivos en las condiciones descritas en la tabla 19.

Cada una de estas pruebas se realizó por triplicado para valorar la robustez de los resultados tras las diferentes aplicaciones. Se observa que en la prueba D se obtienen los valores de extracción superiores, lo que sugiere que la aplicación conjunta de la molturación con ultrasonidos, la oxidación con peróxido de hidrógeno y radiación a diferentes longitudes de onda permite conseguir los mejores resultados.

Tabla 25. Descripción de pruebas comparativas con los diferentes procesos.

Tratamiento del carbón	Molturación con ultrasonidos	Oxidación con H ₂ O ₂	Aplicación radiación a diferentes λ	Resultado 1	Resultado 2	Resultado 3	Resultado promedio de extracción
Prueba A	Si	Si	No	55%	58%	53%	55% \pm 3 %
Prueba B	No	Si	Si	62%	60%	55%	59% \pm 4 %
Prueba C	No	Si	No	13%	15%	17%	15% \pm 2 %
Prueba D	Si	Si	Si	84%	80%	80%	81% \pm 2 %

Por tanto, la actuación conjunta de la molturación por sonicación y de la oxidación con peróxido de hidrógeno bajo irradiación visible entre 500 nm y 590 nm permite conseguir un rendimiento de extracción cercano al 80 % de conversión del carbón en ácidos húmicos, frente a un rendimiento de un 60 % alcanzado por los procesos de oxidación con peróxido de hidrógeno tradicionales.

El aumento significativo en la extracción es debido a la acción conjunta de distintos procesos. Es decir, una vez se ha llevado a cabo la molturación, la aplicación conjunta de peróxido de hidrógeno junto a la radiación a una longitud entre 500 nm y 590 nm provoca un aumento en la oxidación por el efecto fotoeléctrico. La

mayor oxidación favorecida por el efecto fotoeléctrico provoca una modificación de la carga del material mediante el desplazamiento de electrones, lo que permite que el oxígeno proveniente del peróxido de hidrógeno pueda ocupar los huecos dejados por los electrones.

Ambos efectos generan una sinergia en la extracción de sustancias húmicas a partir de carbón, lo que es un efecto relevante y a ser tenido en cuenta en las extracciones intensivas de carbón para la obtención de sustancias húmicas.

3.2.-ESTUDIO DE ACTIVACION DE EXTRACTOS HÚMICOS EN SUSTANCIAS HÚMICAS CON ALTA CAPACIDAD DE COMPLEJACIÓN.

Como se ha explicado en el Capítulo 2, dentro de los distintos tipos de diseños experimentales, se consideró el diseño factorial completo como el más adecuado para este trabajo. Este tipo de diseño se caracteriza porque en él se utilizan todas las posibles combinaciones de los parámetros a todos los niveles considerados en el experimento, por lo que, al considerar dos niveles (máximo y mínimo) el número de ensayos a realizar es 2^k , siendo k como número de factores, siendo en nuestro caso 11, lo que daría un valor de 2048 ensayos. Sin embargo, como también se ha comentado, el número de experimentos a realizar resulta inviable, por la cantidad y el tiempo que se necesitaría (200). Por consiguiente, en este trabajo se ha utilizado un diseño de experimentos fraccional, y el seleccionado ha sido el diseño factorial Plackett-Burman, que permite una aproximación para comprobar si los factores seleccionados son los correctos y si existe efecto entre ellos. Con la metodología analítica mostrada anteriormente, en este apartado se pretende llevar a cabo un estudio de los factores que afectan a los porcentajes de complejación, así como los rangos de actuación de cada uno de ellos. En la tabla 10 se muestran los experimentos que se llevan a cabo en esta parte del trabajo.

Uno de los objetivos en este apartado, además de comprobar la capacidad de complejación de las sustancias húmicas una vez activadas, es también poder efectuar dicha complejación en un solo paso, es decir, con la adición de tres metales como se muestra en la tabla 10, y así poder comprobar si los factores así como sus rangos son los adecuados.

3.2.1.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA COMPLEJACIÓN DE HIERRO.

Los resultados obtenidos para hierro, una vez realizado el muestreo se muestran en la tabla 26.

Tabla 26. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el hierro.

Nº. Exp.	Nombre Exp.	Orden de ejecución	ConcIni (%)	TaPar (µm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)	CompFe
1	N1	6	40	10	8	11	48	1	15	75	6	0	6	60
2	N2	17	40	700	8	11	1	48	15	15	6	6	0	35
3	N3	15	40	700	11	11	1	1	75	15	0	6	6	0
4	N4	19	40	700	11	14	1	1	15	75	0	0	6	0
5	N5	11	10	700	11	14	48	1	15	15	6	0	0	87
6	N6	16	40	10	11	14	48	48	15	15	0	6	0	0
7	N7	18	10	700	8	14	48	48	75	15	0	0	6	0
8	N8	12	40	10	11	11	48	48	75	75	0	0	0	0
9	N9	8	40	700	8	14	1	48	75	75	6	0	0	36
10	N10	5	10	700	11	11	48	1	75	75	6	6	0	82
11	N11	4	10	10	11	14	1	48	15	75	6	6	6	72
12	N12	9	40	10	8	14	48	1	75	15	6	6	6	80
13	N13	20	10	700	8	11	48	48	15	75	0	6	6	0
14	N14	13	10	10	11	11	1	48	75	15	6	0	6	74
15	N15	10	10	10	8	14	1	1	75	75	0	6	0	0
16	N16	1	10	10	8	11	1	1	15	15	0	0	0	0

Con estos resultados se comprobó la influencia de los diferentes factores sobre la variable respuesta.

3.2.1.1.- Análisis estadístico de los resultados del estudio de la complejación de hierro

En la tabla 27 y la figura 40, se muestran los diferentes resultados obtenidos en el estudio para el hierro a partir del test Anova. Los grados de libertad, que nos permiten evaluar la fiabilidad de los factores, fueron 15 sobre los 16 posibles, para la regresión 11 y para los residuales 4, siendo para los residuales un valor bajo que nos limita la fiabilidad de los resultados obtenidos. El valor de R^2 obtenido ha sido de 0.995, lo que indica la linealidad en el ajuste de los resultados. El estadístico F es comparado con el valor crítico de una distribución F de Snedecor, que nos permite evaluar el contraste de hipótesis que tienen los factores sobre la variable respuesta. Para el hierro se obtiene un valor de F de 67,9, mayor que el $F_{crítico}$ 5,81 (obtenido a partir de tablas), lo que implica que la hipótesis nula es rechazada, es decir, que los factores que hemos tomado tienen influencia sobre la complejación del hierro en un 67,9%. Este valor de la Distribución F obtenido para el hierro es calculado sobre el valor de regresión (SD) que es estadísticamente significativo al 95% de nivel de confianza. El valor de la desviación estándar SD de la regresión es 42,72, lo que indica que existe una dispersión alta entre los valores observados respecto a los estimados. En el valor de p se obtiene un valor de 0,000 que indica que la regresión es altamente significativa.

Tabla 27. Tabla de resultados del test Anova para el hierro

CompFe	Grados libertad	Suma de cuadrados	MS	F	p	SD
Total	16	37474	2342,13			
Constante	1	17292,3	17292,3			
Corregidas totales	15	20181,8	1345,45			36,6804
Regresión	11	20074,3	1824,93	67,9043	0,000	42,7192
Residual	4	107,5	26,8751			5,18412
N	16	Q2	0,915	R2Adj	0,98	
Grados de libertad	4	R2	0,995	RSD	5,1841	

En base a estos resultados puede concluirse que los factores seleccionados para estudiar el efecto sobre la complejación del hierro tienen influencia, pero que los valores obtenidos para los experimentos, con esos factores, en el diseño de experimento no son fiables, además de tener elevada dispersión frente al estimado teórico en el estudio.

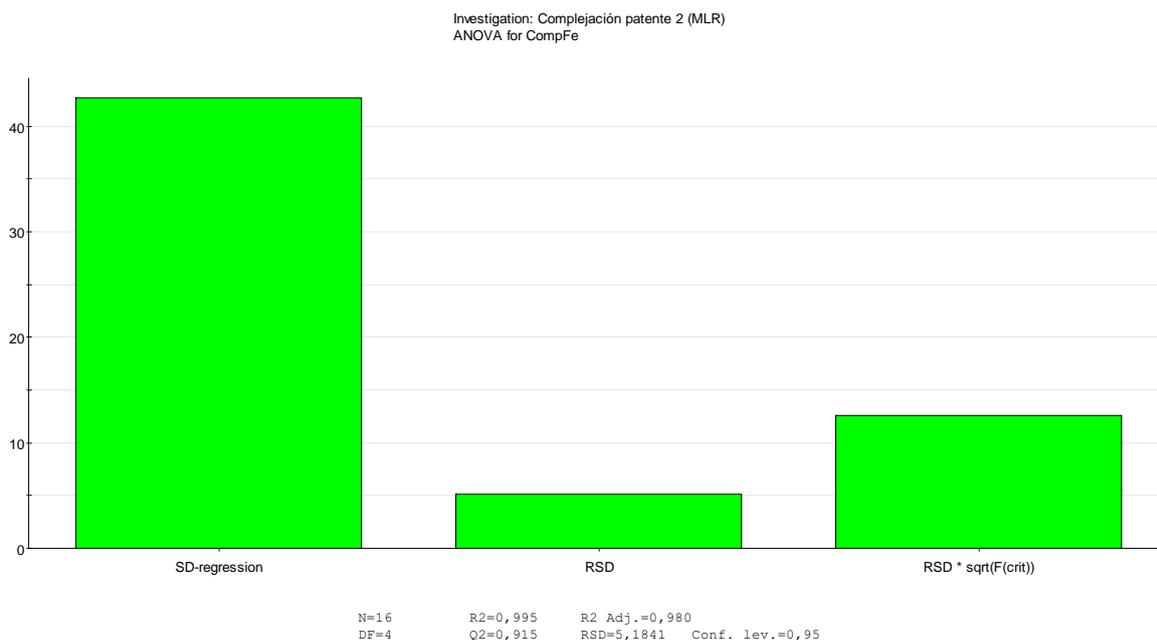


Figura 40. Resultados Test Anova para el hierro.

En los resultados obtenidos para el hierro se han observado dos puntos atípicos, lo que sugiere la existencia de una posible no linealidad o interacciones entre factores que afectan directamente a la variable respuesta, pero con el alcance del estudio realizado en este trabajo no es posible conocer el motivo exacto.

3.2.1.3.- Análisis de influencia de factores para el estudio del hierro.

El estudio estadístico de los residuos permite evaluar qué factores tienen mayor influencia en el grado de complejación de hierro. Como puede observarse en la figura 41, el valor de la concentración de hierro en la mezcla inicial es el factor más influyente. Este resultado es esperable, ya que la presencia inicial de hierro es esencial para que se pueda dar su complejación con sustancias húmicas. También se observa como el pH en la primera reacción (pH_1) con un 6% y el tiempo en la primera reacción (Tie1_Re) con un 5,5% influyen de forma positiva, es decir, a mayor valor de estos factores mayor es porcentaje de complejación. En cambio, también tienen influencia el tiempo en la segunda reacción (Tie2_Re), con un 5,5%, y la concentración inicial de sustancias húmicas (ConIn), con un 7%, lo que implica que cuanto menor es el valor de estos factores mayor es el porcentaje de complejación del hierro.

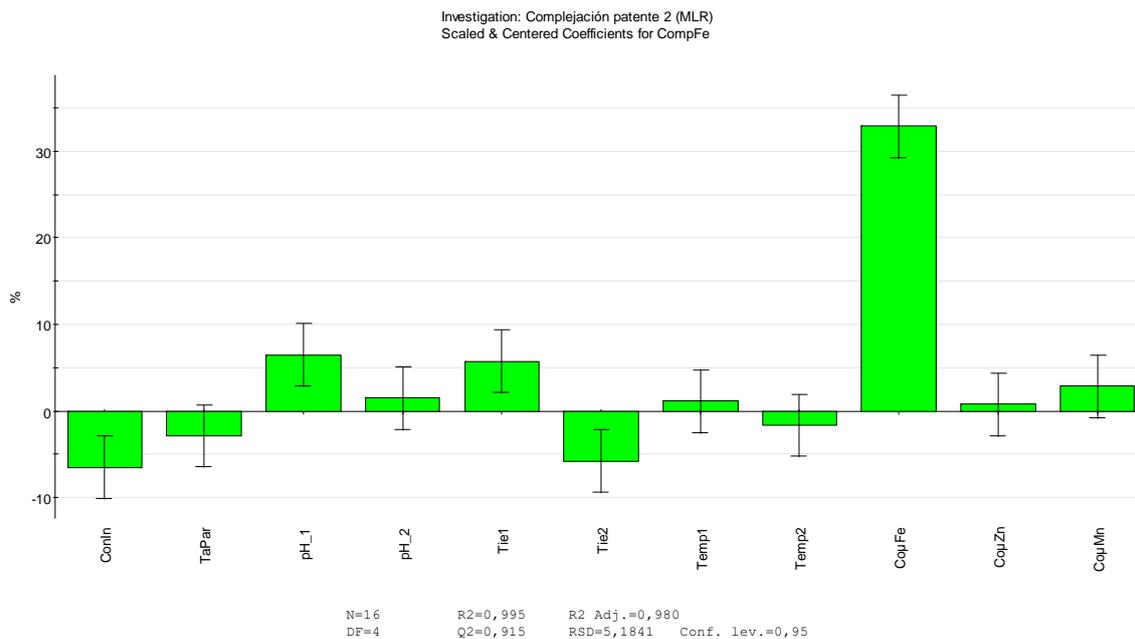


Figura 41. Influencia de factores para el estudio del hierro

En la figura anterior se observa como el tamaño de partícula de las sustancias húmicas (TaPar), el pH en la reacción 2 (pH_2) y ambas temperaturas de las reacciones (Temp1 y Temp2) no tienen influencia sobre la complejación del hierro, lo que implica que independientemente del tamaño de las sustancias húmicas dentro del rango planteado en este estudio (10 µm a 700 µm), el resultado será el mismo. Estos resultados

se deben a que la cantidad de sustancias húmicas es lo suficientemente elevada, lo que permite, en las condiciones de los factores que tienen influencia el hierro sea complejado, por lo que al disminuir esta cantidad sigue siendo favorable a la respuesta obtenida.

Al igual que la concentración de sustancias húmicas, el pH en la segunda reacción no tiene influencia, debido a que la complejación ya se ha llevado a cabo en la primera reacción tanto por el contenido en sustancias húmicas como por las condiciones de pH (pH_1) y tiempo (Tie1_Re) en la primera reacción.

Las temperaturas para ambas reacciones muestran que su valor es indiferente, por lo que, para la posible implantación a diseño industrial, se tomaría la temperatura más baja 15°C, porque supone un ahorro energético y no afecta al proceso.

Como resumen a los resultados obtenidos en la complejación del hierro, cabe destacar que la concentración de sustancias húmicas fue elevada, lo que permitió que en la primera reacción con el rango ajustado de sus factores (pH_1, Tie1_Re) tuviesen la capacidad proporcionar un resultado de complejación alto, sin necesidad de los factores que se dieron en la segunda reacción, a excepción del tiempo en la segunda reacción (Tie2_Re), que sí se demostró.

3.2.1.4.- Análisis de predicción de óptimos para el estudio del hierro.

Se presenta a continuación el estudio de optimización realizado con el programa estadístico sobre las variables de influencia con el programa Modde. Los resultados se presentan en gráficas de superficie, analizando la influencia entre los factores que afectan al porcentaje de complejación del hierro. Este análisis se llevó a cabo factor a factor y permite observar para qué valor de ese factor a estudio se obtuvo mayor porcentaje de complejación. Los resultados se muestran de una forma gráfica mediante escala de colores, de más bajo-frío (menor porcentaje) a más alto-cálido (mayor porcentaje).

Este análisis se llevó a cabo sobre los factores observados en el anterior apartado que tenían mayor influencia en el estudio sobre la variable respuesta (Figura 41). En el estudio de complejación del hierro los factores han sido la concentración inicial de sustancias húmicas (ConIni), pH en la primera reacción (pH_1), el tiempo en la primera reacción (Tie1_Re), el tiempo en la segunda reacción (Tie2_Re) y la concentración de hierro (Co μ Fe).

A continuación, se muestran los estudios predictivos sobre los factores. En esta investigación se ha buscado la influencia de las sustancias húmicas sobre la complejación de los metales, por dicho motivo, en las predicciones siguientes se busca la relación de los rangos seleccionados de los factores frente a la concentración inicial de sustancias húmicas.

Análisis de predicción para la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcIni) frente al pH en la primera reacción (pH_1.)

Como puede observarse en figura 42, los valores máximos sobre la variable respuesta se obtienen cuando la concentración inicial de sustancias húmicas está en valores del 10% al 15% y el pH en la primera reacción (pH_1) oscila entre 10,5 y 11.

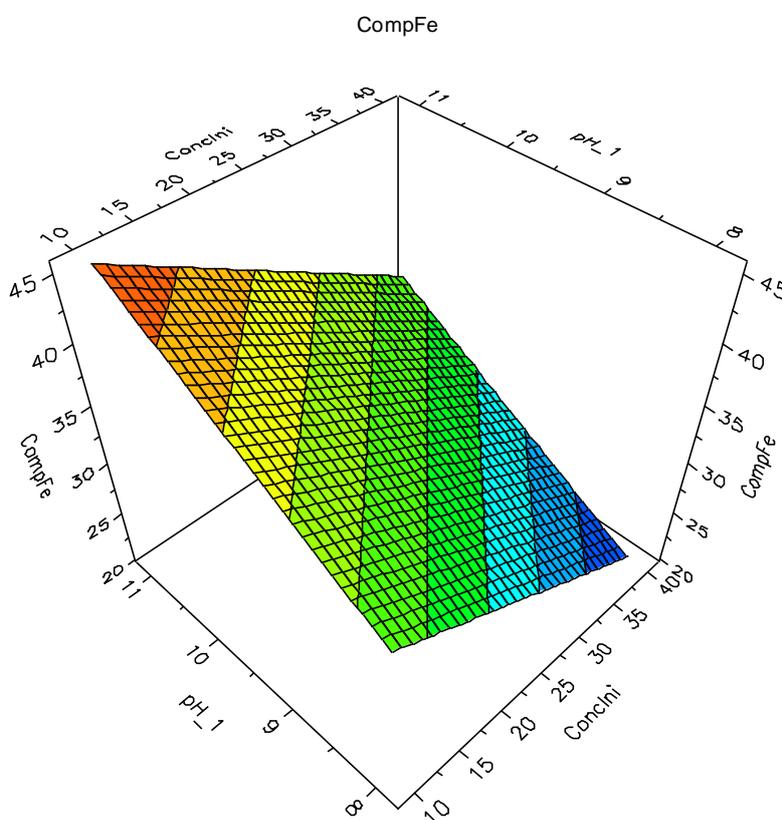


Figura 42. Análisis de predicción de los factores ConcIni y pH_1 frente al porcentaje de complejación del hierro

La zona roja muestra que una concentración de sustancias húmicas entre el 10% y 15% y un pH en la primera reacción entre 10,5 y 11 ya se obtiene un porcentaje de complejación del 45%, no siendo un valor elevado

pero significativo como valor de complejación en un fertilizante, que exige, que al menos un 50% del metal, este complejoado.

Análisis de predicción para la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcIni) frente al tiempo en la primera reacción (Tie1_Re).

El gráfico de la figura 43 muestra que para tener mayor grado de complejación de Fe los tiempos de reacción en la primera fase deben ser mayores de 35 horas.

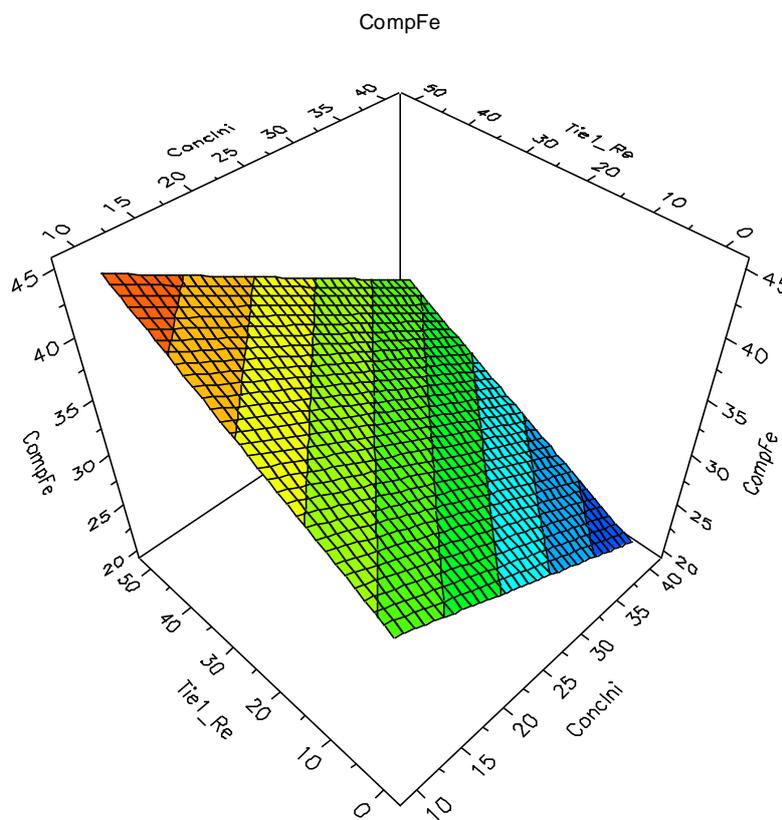


Figura 43. Análisis de predicción de los factores ConcIni y Tie1_Re frente al porcentaje de complejación del hierro

Al igual que el caso anterior con el pH, en la primera reacción con una concentración de sustancias húmicas similar al caso anterior, 10%-15%, y con un tiempo entre 40 y 50 horas, se obtiene un 45% de complejación, que al igual que para el hierro, es un valor bajo para un fertilizante

Análisis de predicción de la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcInI) frente al tiempo en la segunda reacción (Tie2_Re).

El análisis predictivo que nos muestra el software en base a los experimentos realizados muestra que la concentración inicial de sustancias húmicas en función del tiempo de reacción muestra que, para tener elevados valores de porcentaje de complejación, los tiempos de reacción en la segunda fase deben estar entre 0 y 10 horas (figura 44). Para estos tiempos de reacción, el valor de la variable concentración inicial oscila entre un 10% y un 15%.

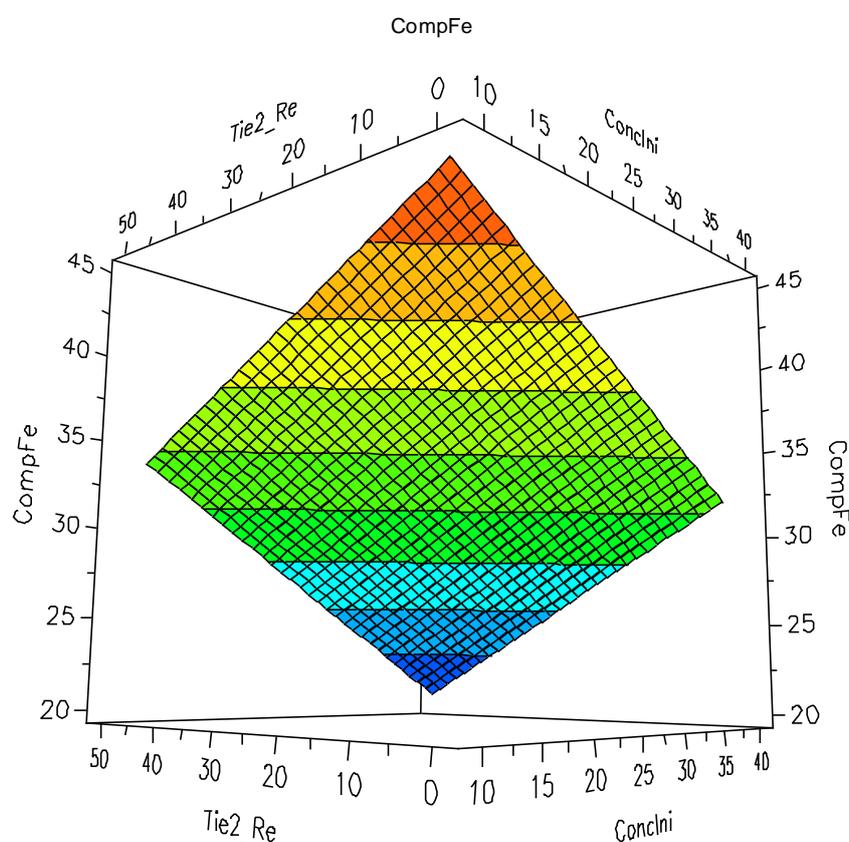


Figura 44. Análisis de predicción de los factores ConcInI y Tie2_Re frente al porcentaje de complejación del hierro.

Como se ha comentado en el apartado 3.2.1.3, el tiempo en la segunda reacción (Tie2_Re) es uno de los factores que tiene influencia sobre la complejación y, como se ha comentado se encuentra en un rango de entre 1 y 10 horas. El valor mínimo (1 hora) puede ser considerado un tiempo de estabilización de la reacción.

Análisis de predicción de la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcInI) frente a la concentración de hierro (ConμFe).

Tal y como se observa en la figura 45, a mayores valores de concentración inicial de hierro, más complejación se obtiene.

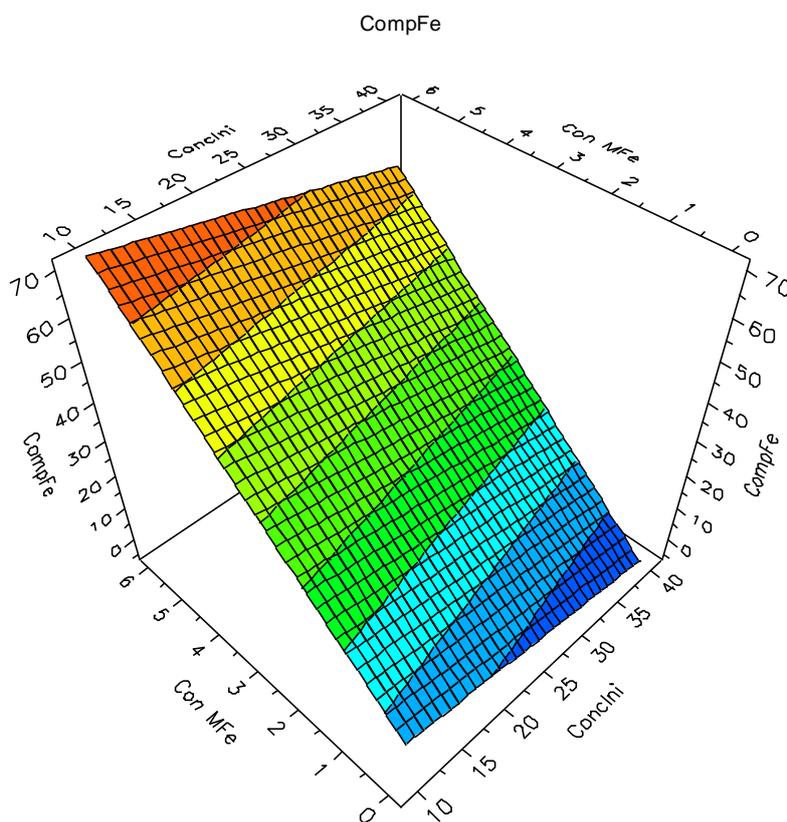


Figura 45. Análisis de predicción de los factores ConcInI y ConμFe frente al porcentaje de complejación del hierro

Concretamente, la figura anterior muestra que con concentraciones iniciales de sustancias húmicas entre el 10 y el 30% y valores entre el 5% y 6% de concentración de hierro se obtienen valores de complejación superiores al 70%.

Predicción de valores óptimos del estudio para el hierro

Una vez analizados los resultados de los valores óptimos de cada uno de los factores con influencia sobre la complejación del hierro, se muestra un resumen donde puede verse el rango óptimo de cada uno de los diferentes factores (tabla 28). Como el estudio predictivo ha sido efectuado siempre frente a la concentración

inicial de sustancias húmicas que es la base a estudio en este trabajo, implica que el valor óptimo es un rango que cubre el resto de óptimos de los factores.

Es destacable que, a concentraciones bajas de sustancias húmicas, entre un 10% y 15%, ya se obtienen valores del 45% de complejación y que este valor aumenta cuando la aumenta la concentración de hierro (Con μ Fe) hasta un 70%. Además de la concentración inicial de sustancias húmicas, existen otros factores que también afectan a la complejación como el pH y el tiempo en la primera reacción y la concentración de hierro. Cuando estas variables incrementan su valor también lo hace el porcentaje de complejación. En cambio, las variables concentración de sustancias húmicas y tiempo en la reacción 2 correlacionan negativamente con la complejación. Para el resto de factores, para determinar un óptimo, se considera que cualquier valor dentro del rango establecido en el experimento es válido. Por dicho motivo se tomarán los rangos que supongan un menor coste económico y duración del proceso. Para el tamaño de partícula de los extractos húmicos el tamaño puede oscilar de 10 a 700 μ m, pero un tamaño menor favorece la dosificación del producto final, evitando obturaciones en los goteros, por lo que se determina un valor adecuado que oscila entre las 10 - 200 μ m. El pH de la primera reacción (pH_1) está acotado entre 10,5 y 11, siendo un rango relativamente estrecho frente al obtenido para la segunda reacción (pH_2), que oscila entre 12,5 y 14, lo que indica que el primer pH es limitante para obtener un valor elevado de complejación. El tiempo de reacción se encuentra entre 40 y 48 horas para la fase 1 y de 1 y 10 horas para la fase 2, teniendo un tiempo de reacción elevado en la primera reacción y un tiempo menor en la segunda (Tie2_Re) que puede ser debido a que el tiempo en la segunda reacción sea en la práctica un tiempo de estabilización, ya que en la primera reacción es donde se ha producido la complejación. Por último, el factor temperatura no tiene influencia sobre la complejación en ninguna de las dos reacciones, por lo que se toma siempre un rango de temperatura entre 15°C y 25°C.

Tabla 28. Predicción de valores óptimos para la complejación del hierro

	Conclni (% EH)	TaPar (μ m)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (Horas)	Tie2_Re (Horas)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe
Valores óptimos	10-30-	10-200	10,5-11	12,5-14,0	40-48	1-10	15-25	15-25	6

3.2.2.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA COMPLEJACIÓN DE MANGANESO

El estudio llevado a cabo para el manganeso es el mismo al realizado para el hierro. En la tabla 29 se muestran los resultados obtenidos en el diseño de experimentos Plackett-Burman.

Tabla 29. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el manganeso.

Nº. Exp.	Nombre Exp.	Orden de ejecución	Conclni (%)	TaPar (µm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)	CompMn
1	N1	6	40	10	8	11	48	1	15	75	6	0	6	45
2	N2	17	40	700	8	11	1	48	15	15	6	6	0	0
3	N3	15	40	700	11	11	1	1	75	15	0	6	6	7
4	N4	19	40	700	11	14	1	1	15	75	0	0	6	32
5	N5	11	10	700	11	14	48	1	15	15	6	0	0	0
6	N6	16	40	10	11	14	48	48	15	15	0	6	0	0
7	N7	18	10	700	8	14	48	48	75	15	0	0	6	55
8	N8	12	40	10	11	11	48	48	75	75	0	0	0	0
9	N9	8	40	700	8	14	1	48	75	75	6	0	0	0
10	N10	5	10	700	11	11	48	1	75	75	6	6	0	0
11	N11	4	10	10	11	14	1	48	15	75	6	6	6	34
12	N12	9	40	10	8	14	48	1	75	15	6	6	6	43
13	N13	20	10	700	8	11	48	48	15	75	0	6	6	48
14	N14	13	10	10	11	11	1	48	75	15	6	0	6	36
15	N15	10	10	10	8	14	1	1	75	75	0	6	0	0
16	N16	1	10	10	8	11	1	1	15	15	0	0	0	0

3.2.2.1.- Análisis estadístico de los resultados del estudio de la complejación de manganeso.

En la tabla 30 y en la figura 46, se muestran de forma esquemática los valores para los principales indicadores del test Anova. En el estudio del manganeso se obtiene una desviación estándar sobre la regresión de 25,10. Los grados de libertad son los mismos que en el caso del hierro, 15 en total, 11 en la regresión y únicamente 4 en los residuales, lo que implica que la fiabilidad sobre los resultados es baja. El estadístico F tiene un valor de 14,78 frente al F crítico de 6,00, obtenido para un 95% de confianza. Como se ha mencionado anteriormente, al ser el F crítico inferior al F estadístico obtenido en el estudio, se concluye que los factores seleccionados influyen en el porcentaje de complejación en una medida considerablemente menor que para el hierro (67, frente a 14,78). Como se muestra en los siguientes apartados, el número de factores que afectan a la complejación del manganeso es menor que para el hierro (5 frente 3).

Tabla 30. Tabla de resultados del test Anova para el manganeso

CompMn	Grados libertad	Suma de cuadrados	MS	F	p	SD
Total	16	12728	795,5			
Constante	1	5625	5625			
Corregidas totales	15	7103	473,533			21,7608
Regresión	11	6932,5	630,227	14,7854	0,010	25,1046
Residual	4	170,5	42,625			6,52878
N	16	Q2	0,616	R2Adj	0,91	
Grados de libertad	4	R2	0,976	RSD	6,5288	

Para que el ajuste tenga significancia, es decir validez estadística, el valor de p debe ser lo más cercano a 0 y, al igual que sucede para el hierro, que tiene un valor de 0, en el manganeso tiene un valor de 0,01. La linealidad de la regresión se ajusta con un R2 de 0,976, valor cercano a 1, lo que implica que los valores se han ajustado al modelo lineal con la regresión estandar antes mencionada de 25,1.

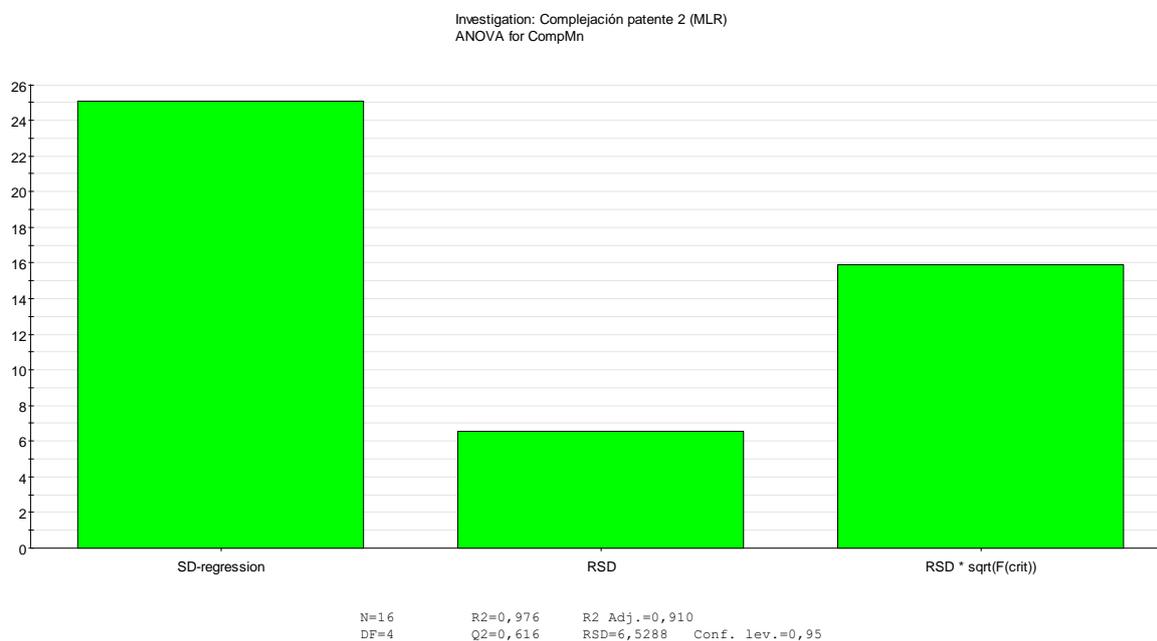


Figura 46. Resultados Test Anova para el manganeso.

3.2.2.2.- Análisis de influencia de factores para el estudio del manganeso.

Para el análisis de los factores que tienen influencia sobre el porcentaje de complejación del manganeso se consideran los siguientes: el pH en la reacción 1 (pH₁), el tiempo en la reacción 1 (Tie1_Re) y la concentración de manganeso (Con_μMn). Estos factores tienen un porcentaje de influencia normalizado que como máximo alcanza el 20 % para el factor de Con_μMn, siendo el siguiente el tiempo en la reacción 1 (Tie1_Re) con un valor del 5%.

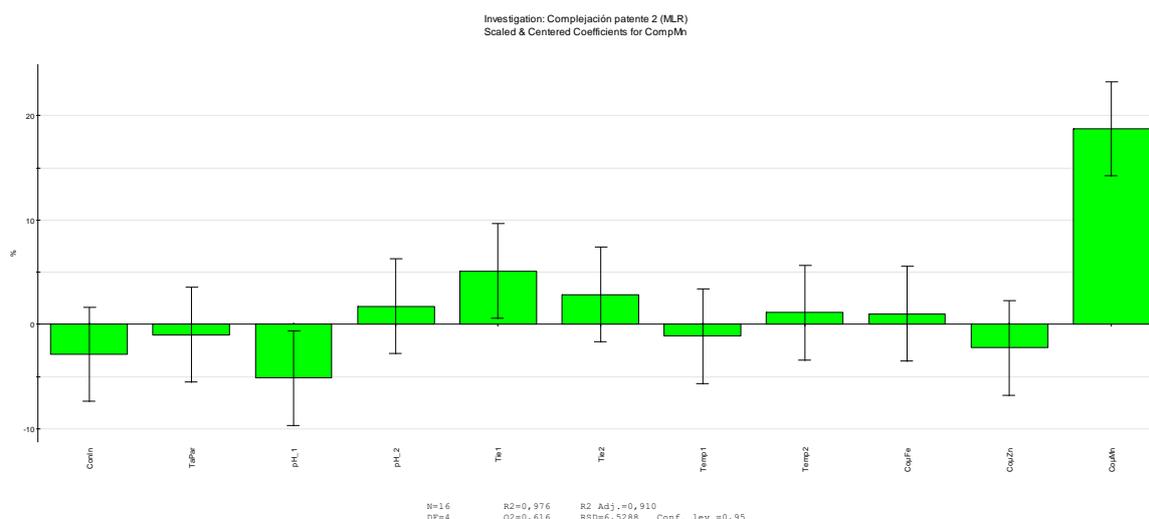


Figura 47. Influencia de factores para el estudio del manganeso

Aunque en este estudio no ha aparecido como factor influyente, la concentración de sustancias húmicas sí que se ha de tener en cuenta en las diferentes predicciones ya que de este factor depende que el porcentaje de complejación de manganeso sea mayor que cero.

3.2.2.4.- Análisis de predicción de óptimos para el estudio del manganeso.

De forma similar a estudio realizado para el hierro, se analizaron los rangos óptimos obtenidos en base a los estudios estadísticos que el programa Modde nos facilita en forma de gráficas.

Los estudios de predicción con el manganeso se llevaron a cabo analizando el efecto que tienen los factores dos a dos, siendo uno de los factores siempre la concentración de sustancias húmicas, para así de ese modo evaluar el efecto que tiene la concentración de estos sobre la complejación del manganeso. Como ya se mencionado previamente, aunque en el análisis mostrado en la figura 47 no aparece la concentración de

sustancias húmicas como factor relevante, sí que se considera en la predicción, por su necesidad el experimento.

A continuación, se muestran los análisis predictivos para cada uno de los factores frente a la concentración inicial de sustancias húmicas (ConIni) para obtener la máxima complejación de manganeso.

Análisis de predicción de la concentración inicial de sustancias húmicas (ConIni) frente al pH en la primera reacción (pH_1).

Como se muestra en la figura 48, el máximo de complejación para el manganeso obtenido con estos dos factores es de un 26%, valor bajo para lo comercialmente recomendado. Este valor de complejación es obtenido con una concentración de sustancias húmicas entre el 10% y el 15% frente a un pH en la primera reacción (pH_1) entre 8 y 8,5.

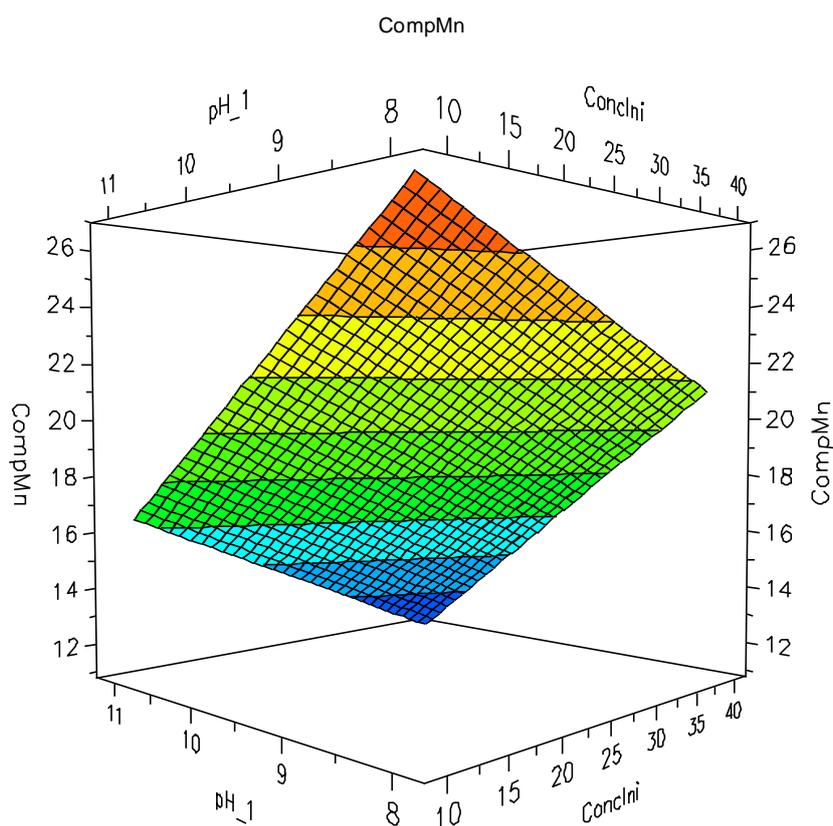


Figura 48. Análisis de predicción de los factores ConIni y pH_1 frente al porcentaje de complejación del manganeso.

El bajo valor de complejación de manganeso puede ser debido a que los rangos seleccionados para los factores en este proceso no han sido los adecuados, lo que vendría a justificar que el rango de concentración de sustancias húmicas no tenga influencia sobre la complejación del manganeso.

Análisis de predicción de la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcIni) frente al tiempo en la primera reacción (Tie1_Re).

El porcentaje de complejación tampoco es en este caso superior al 26%, cuando la concentración de sustancias húmicas oscila entre un 10% y un 15% para un rango en el tiempo de reacción de 40 a 45 horas (Figura 49).

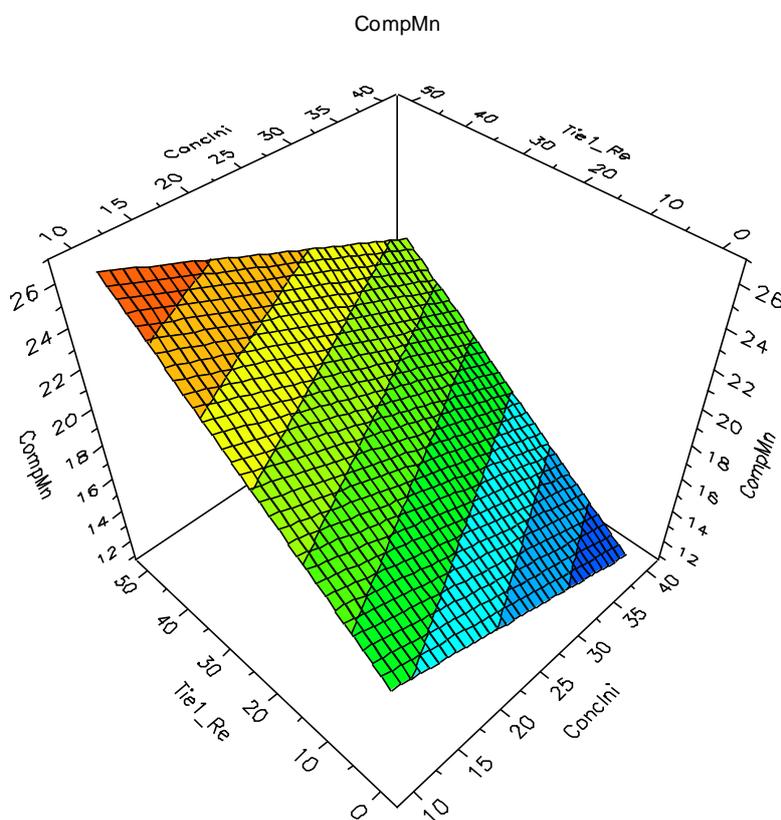


Figura 49. Análisis de predicción de los factores ConcIni y Tie1_Re frente al porcentaje de complejación del manganeso.

Del mismo modo que para la predicción de la variable pH, el tiempo de reacción en la primera etapa se ve influenciado por el contenido en sustancias húmicas, lo que provocará que el tiempo de reacción quede fuera del rango establecido.

Análisis de predicción de la concentración inicial de sustancias húmicas (ConcIni) frente a la concentración de manganeso (Con μ Mn).

El factor de concentración del manganeso (Con μ Mn) es el que más influencia tiene sobre el resultado de complejación del manganeso, obteniendo un valor máximo de 40%. En la figura 50 se muestra como la tendencia de concentración de sustancias húmicas llega hasta un 35%-40%, que es el máximo de concentración estudiada en el experimento.

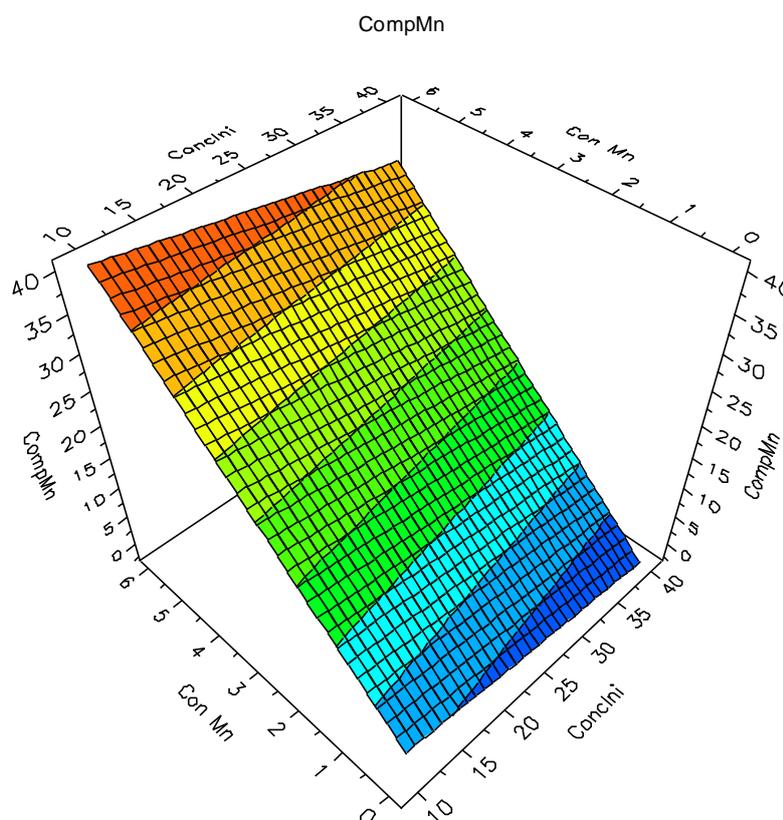


Figura 50. Análisis de predicción de los factores ConcIni y Con μ Mn frente al porcentaje de complejación del manganeso.

A mayores concentraciones de sustancias húmicas y de concentración de manganeso, se obtiene mayor porcentaje de complejación

Valores óptimos del estudio para el manganeso

Como se ha determinado previamente, los factores de pH y tiempo de la primera reacción, así como la concentración de manganeso tienen influencia sobre porcentaje de complejación del manganeso. Con estos

factores se ha realizado el análisis de los rangos óptimos. El resto de factores, como se muestra en la figura 47, no tiene influencia directa o están fuera de rango en el estudio. Los criterios de selección de los rangos óptimos se basaron en cuestiones de ahorro tanto en tiempo como en coste económico, a excepción del tamaño de partícula de las sustancias húmicas, siendo el mismo rango en este caso que para el hierro para evitar problemas en la dosificación del producto fertilizante en el futuro. Para el tamaño de partícula de las sustancias húmicas el rango oscila entre 10 μm y 200 μm . Los tiempos empleados en la reacción 1, oscilan entre 40 y 45 horas, en cambio, para el tiempo en la segunda reacción, puede oscilar en el rango completo seleccionado en el estudio, ya que con el tiempo empleado en la primera reacción, así como las condiciones de pH y temperatura, no se consiguió un valor aceptable de complejación del manganeso. La temperatura óptima de reacción en tiene como valor óptimo 25°C ya que es la temperatura tomada como ambiente y supone un menor coste en el proceso de producción a mayor escala. A continuación, se muestra un resumen en la tabla 31.

Tabla 31. Valores óptimos para la complejación del manganeso

	Conclni (% EH)	TaPar (μm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (Horas)	Tie2_Re (Horas)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMZn
Valores óptimos	10-35	10-200	8,0-8,5	12,5-14,0	40-45	40-45	255	25	6

A diferencia de los valores obtenidos para el hierro, en el caso del manganeso, queda reflejado que no se ha conseguido el objetivo de maximizar la complejación, siendo el principal motivo que los rangos seleccionados para el manganeso están fuera de los definidos en el estudio. Como ejemplo, cuanto mayor es el contenido de manganeso, mayor cantidad de sustancias húmicas se requiere para la reacción, lo cual puede condicionar los siguientes factores implicados en el proceso.

3.2.3.- RESULTADOS OBTENIDOS EN EL ESTUDIO DE LA COMPLEJACIÓN DE CINCO.

En el caso del cinc utilizándose emplean las mismas herramientas de análisis que para el hierro y el manganeso (Tabla 32).

Tabla 32. Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el cinc.

Nº. Exp.	Nombre Exp.	Orden de ejecución	ConcIni (%)	TaPar (µm)	pH_1	pH_2	Tie1_Re (hr)	Tie2_Re (hr)	Temp1 (°C)	Temp2 (°C)	ConMFe (%)	ConMZn (%)	ConMn (%)	CompZn
1	N1	6	40	10	8	11	48	1	15	75	6	0	6	0
2	N2	17	40	700	8	11	1	48	15	15	6	6	0	25
3	N3	15	40	700	11	11	1	1	75	15	0	6	6	10
4	N4	19	40	700	11	14	1	1	15	75	0	0	6	0
5	N5	11	10	700	11	14	48	1	15	15	6	0	0	0
6	N6	16	40	10	11	14	48	48	15	15	0	6	0	85
7	N7	18	10	700	8	14	48	48	75	15	0	0	6	0
8	N8	12	40	10	11	11	48	48	75	75	0	0	0	0
9	N9	8	40	700	8	14	1	48	75	75	6	0	0	0
10	N10	5	10	700	11	11	48	1	75	75	6	6	0	71
11	N11	4	10	10	11	14	1	48	15	75	6	6	6	57
12	N12	9	40	10	8	14	48	1	75	15	6	6	6	65
13	N13	20	10	700	8	11	48	48	15	75	0	6	6	56
14	N14	13	10	10	11	11	1	48	75	15	6	0	6	0
15	N15	10	10	10	8	14	1	1	75	75	0	6	0	33
16	N16	1	10	10	8	11	1	1	15	15	0	0	0	0

3.2.3.1.- Análisis estadístico de los resultados del estudio de la complejación de cinc

Una vez realizados los experimentos para el test el cinc se llevó a cabo el estudio estadístico de los resultados obtenidos, los cuales se muestran en la tabla 33 y en la figura 51. Como en los dos casos anteriores, los grados de libertad son 15 en total, 11 en la regresión y 4 en los residuales. La desviación estándar obtenida para el zinc muestra un valor de 20,91 y unos valores de regresión superiores al 30%. Para el estadístico F, se obtiene un valor de 2,79 frente a un Fcrítico de 5,95, lo que implica que los factores del estudio no tienen influencia sobre la complejación del cinc. La obtención de este resultado estadístico en el presente estudio no significa que los factores no tengan ninguna influencia real en la complejación del cinc, sino que posiblemente que exista algún motivo que implique que en este ajuste no tienen trascendencia y debe de ser tratado de forma diferente para evaluar de nuevo los factores

Cabe resaltar también que, a diferencia con el hierro y el manganeso, la mediana (Q2) para el cinc es negativa, lo que implica que la distribución de datos es asimétrica con cola a la derecha y el modelo de ajuste no es significativo.

El estadístico F, $RSD \times \sqrt{F_{crítica}}$, muestra la validez del modelo y cuando este es superior a la desviación estándar, se concluye una falta de ajuste en el modelo y poca reproducibilidad en los datos (Figura 51).

Tabla 33. Tara de resultados del Test Anova para el cinc

CompZn	Grados libertad	Suma de cuadrados	MS	F	p	SD
Total	16	24690	1543,13			
Constante	1	10100,3	10100,3			
Corregidas totales	15	14589,8	972,65			31,1873
Regresión	11	12910,3	1173,66	2,79526	0,167	34,2587
Residual	4	1679,5	419,875			20,4909
N	16	Q2	-0,842	R2Adj	0,568	
Grados de libertad	4	R2	0,885	RSD	20,491	

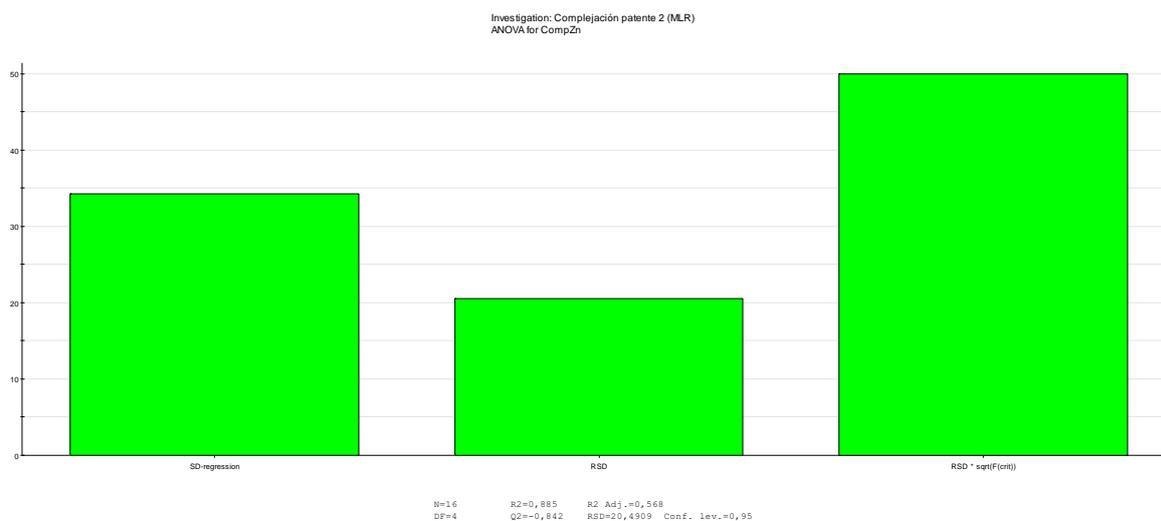


Figura 51. Resultados Test Anova para el cinc.

Con los datos obtenidos el programa estadístico Modde también nos muestra el efecto de los factores sobre la complejación del cinc (Figura 52).

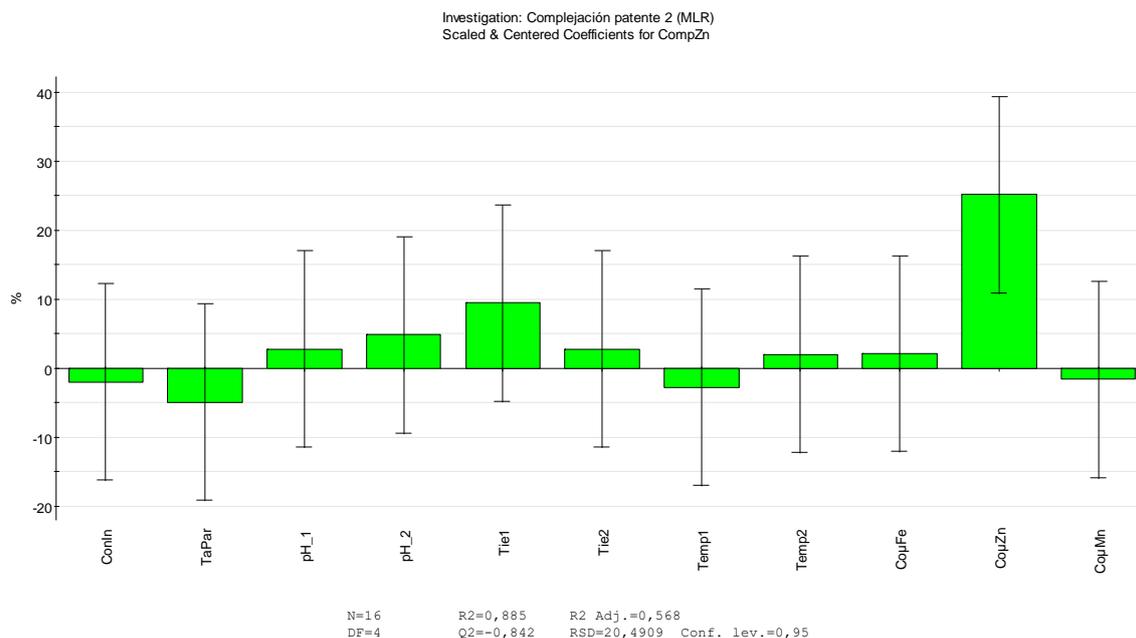


Figura 52. Influencia de factores para el estudio del cinc

Tal y como se observa en la figura anterior, ninguno de los factores seleccionados afecta a la complejación del cinc excepto la concentración de cinc, que se relaciona directamente con el porcentaje de cinc complejado (variable respuesta).

El hecho de que no se haya encontrado relación entre los distintos factores con la complejación de cinc, a excepción de la concentración inicial del metal, puede ser debido a la existencia de un efecto físico-químico no contemplado en el análisis que dificulta la complejación del cinc, o bien, que los rangos óptimos de los factores para la complejación del cinc no son los mismos que del hierro y manganeso, o bien ambas.

Según diferentes estudios que se pueden encontrar en la literatura científica, como el de Ahrens L.H. (201) en la complejación del cinc con aminoácidos, el potencial de ionización y el radio del metal pueden tener influencia en la complejación cuando coexisten con otros metales (202). El cinc tiene un potencial de ionización superior que el hierro y el manganeso (906,4 kJ/mol frente a 762,5 kJ/mol del hierro y 717,3 kJ/mol del manganeso) y un radio atómico inferior que el hierro y el manganeso (1,5 Å para cinc y 1,8 Å para el hierro y 1,9 Å para el manganeso). Esto se puede explicar por la mayor cantidad de energía requerida para ser complejado (un 20% más frente a los otros metales), los cuales ocupan los principales puntos o “huecos” de complejación antes que el cinc y este requiera de otros huecos para poder ser alojado (complejado), pero para ello es necesario que se den unas condiciones (rangos) de los factores diferentes a las establecidas para

este estudio, lo que dificultaría la complejación de los otros dos metales (Fe y Mn), especialmente la del hierro.

Por lo anteriormente mencionado, se puede concluir que la razón más probable de los resultados anómalos en el estudio de complejación del cinc sea la tercera que es una mezcla de la primera y la segunda que están directamente relacionadas, ya que los rangos seleccionados para el zinc como los efectos físicos pueden incidir en los resultados.

En consecuencia a los resultados obtenidos, el estudio de óptimos así como los gráficos de superficie para el zinc quedan descartados, ya que ninguno de los factores a excepción de la concentración de cinc muestra alguna influencia sobre el porcentaje de complejación.

3.2.4.- CONCLUSIONES

En resumen, el análisis de los resultados evidencia que los factores seleccionados en el estudio afectan de forma distinta en la complejación de micronutrientes por las sustancias húmicas. La respuesta diferencial en la complejación de cada micronutriente se puede explicar por las diferencias entre estos en cuanto a su peso molecular, radio atómico y potencial de electronegatividad. Concretamente, tanto el radio atómico como el potencial de electro negatividad tienen un efecto negativo sobre la complejación de metales, por lo tanto, valores bajos para estos parámetros implican mejores resultados en la complejación (201, 202).

En los casos del hierro y el manganeso, se determinó que los factores elegidos en cada caso para evaluar la variable respuesta de complejación tienen influencia y se pudo determinar en qué modo afectan, sin embargo, en el caso del cinc los resultados obtenidos no permiten extraer conclusiones sobre la influencia de dichos factores en el grado de complejación, posiblemente, debido al efecto de fenómenos físico-químicos y a los rangos de los factores seleccionados. Como se ha mencionado anteriormente, la influencia negativa en la variable respuesta de los otros dos metales (Fe y Mn) tratados en el experimento, por lo que se considera que el cinc tiene un comportamiento diferente cuando el se localiza “sólo” frente a las sustancias húmicas y “acompañado” en este caso con hierro y manganeso frente a las sustancias húmicas, que puede provocar que los extractos húmicos obtenidos tengan cierta selectividad por las características del cinc frente al hierro y manganeso. Esta selectividad puede provocar que, aunque se obtengan valores de complejación válidos, el efecto de las variables en el proceso con el cinc no pueda ser semejante al efecto que sucede con

el hierro y manganeso. Una de esos factores importantes es el pH del proceso de complejación que como explica Sonh L Mary (203), el cinc requiere un pH entre 5 y 7 para estabilizarlos en sustancias húmicas y por dicho motivo ciertos metales como el cinc son complejados con más facilidad por los ácidos fúlvicos (204).

Cabe destacar que, en los resultados obtenidos para determinar los rangos óptimos en las variables de trabajo, la concentración de extracto húmico oscila entre un 10 % hasta un 40 %, siendo necesaria para el hierro una cantidad mayor de extracto. En cuanto al tamaño de partícula de los extractos húmicos, se determinó que cuanto menor es este, mayor es la complejación.

El rango de valores de pH del proceso de complejación, que viene dado por los pH de trabajo, oscila, en el caso del pH₁ tanto para el hierro como para el manganeso, entre 10 y 11 y entre 12.5 y 14 en el caso del pH₂.

Respecto a los tiempos necesarios para darse la reacción (Tie1_Re y Tie2_Re), en el caso del primer tiempo de reacción para el hierro y el manganeso se determinó que se requiere un tiempo que oscila entre las 40 y 48 horas, en cambio, en el segundo tiempo de reacción para el hierro el rango de reacción es mucho más amplio, entre 5 y 48 horas, lo que indica que en esta segunda etapa de complejación se requiere menos tiempo para la complejación del hierro que para la del manganeso, que requiere entre 40 y 48 horas.

En cuanto a la temperatura de reacción, sí que existe una mayor diferencia entre los óptimos para cada uno de los metales. Con el hierro la Temp1 oscila entre 15°C y 50°C; en cambio para el manganeso esta está entre 25°C y 75°C. Para la Temp2, el hierro mantiene el mismo rango de temperatura de reacción que la Temp1, es decir, de 15°C y 50°C, en cambio para el manganeso esta oscila entre 25°C y 75°C.

El objetivo principal de este estudio ha sido obtener las variables relevantes, así como los rangos de operación de las mismas, en el proceso de complejación de metales con sustancias húmicas. También se observa en base a los resultados que hay interacciones entre variables o que haya una ausencia de linealidad, pero que con el diseño Placket-Burman no se puede determinar, con todo esto el trabajo realizado, a sacrificado cierta información que puede proporcionar un diseño detallado de experimentos por la rapidez y la economía de los resultados.

Cabe resaltar que el estudio ha permitido obtener las variables relevantes de manera rápida en los casos del hierro y el manganeso, para los cuales se han obtenido rangos óptimos adecuados. Los resultados obtenidos han facilitado la evaluación de dichas variables en el laboratorio y su posterior implantación en planta industrial. Para ello se han utilizado tecnologías habituales en los procesos de reacciones químicas

industriales. En el caso del cinc se tendría que llevar a cabo un estudio más detallado, con otros rangos de operación, junto con un nuevo diseño factorial, valorando qué variables pueden tener influencia directa sobre la complejación del cinc con sustancias húmicas.

3.3.- ESTUDIO DE EFICIENCIA AGRONÓMICA DEL PRODUCTO OBTENIDO COMO COMPLEJO DE HIERRO FRENTE A UN PRODUCTO COMERCIAL.

3.3.1.-ENSAYOS EN CÁMARA DE CULTIVO

3.3.1.1.- Introducción

En este apartado se muestran los resultados obtenidos en los diferentes ensayos agronómicos, tanto en cámara de cultivo como en campo.

Como se explica en el apartado de métodos, en primer lugar se llevó a cabo la germinación de las semillas y el crecimiento durante los primeros 15 días en cultivo hidropónico para posteriormente colocarlas en el suelo.

El análisis fisicoquímico del suelo de Utrillas es el mostrado en la tabla 34. Es un suelo que tiene un pH básico, con un nivel adecuado de materia orgánica y con un contenido en los principales macronutrientes aceptable, pero con una caliza activa del 14% que genera inconvenientes a la hora de la absorción de nutrientes por parte del cultivo, por dicho motivo es un suelo adecuado para la realización de este tipo de pruebas.

Tabla 34. Análisis fisicoquímico de suelo procedente de Utrillas.

Parámetro	Metodología	Resultados		Nivel óptimo
pH (extracto 1:2,5)	Electrometría	8,15	unidades de pH	6,4-7,5
Conductividad 25°C (extracto 1:5)	Conductimetría	0,168	dS/m	<0,4
Nitrógeno total	Kjeldhal	0,101	%	0,11-0,22
Nitrógeno amoniacal	Fotometría	27	mg/kg	5-10
Materia orgánica	Calcinación	2,60	%	2,0-2,5
Carbono orgánico	Cálculo aritmético	1,51	%	1,4-1,8
Relación C/N	Cálculo aritmético	14,9		9-11
Fósforo asimilable	Gravimetría	64,9	mg/kg	22-30
Potasio asimilable	Gravimetría	315,6	mg/kg	150-300
Calcio asimilable	ICP-OES	2.775	mg/kg	2000-4000
Magnesio asimilable	ICP-OES	66,7	mg/kg	300-600
Carbonatos totales	Calcimetría	10,9	%	10-20
Caliza activa	Valoración redox	14,4	%	<6
Capacidad Intercambio Catiónico (C.I.C)	ICP-OES	16	meq/100g	13-25
Potasio cambiabile	ICP-OES	3,80	meq/100g	0,30-0,75
Calcio cambiabile	ICP-OES	7,55	meq/100g	6,0-14,0
Magnesio cambiabile	ICP-OES	3,15	meq/100g	1,0-3,0
Sodio cambiabile	ICP-OES	0,64	meq/100g	0,3-0,8
Cobre	ICP-OES	1,6	mg/kg	>1
Hierro	ICP-OES	25,8	mg/kg	2,5-4,5
Manganeso	ICP-OES	25,0	mg/kg	20-50
Cinc	ICP-OES	10,7	mg/kg	>0,5
Porcentaje de sodio intercambiable	Cálculo aritmético	0,6	%	<15
Textura	Aerometría	65,2	Arena %	
		18,6	Limo %	
		16,2	Arcilla %	

Los tratamientos aplicados en este ensayo fueron los siguientes, en base lo descrito en el apartado de métodos 2.2.5.

- Control de referencia del ensayo o Tratamiento 1.
- Quelato comercial (LibFer) o Tratamiento 2.
- Fertilizante nuevo desarrollado en este trabajo o Tratamiento 3.
- Hierro sin complejar o Tratamiento 4.
- Mezcla de producto comercial y nuevo fertilizante o Tratamiento 5.

3.3.1.2.- Resultados en cámara de cultivo

En este apartado se detallan los resultados obtenidos en las pruebas realizadas en cámara de cultivo. Para cada uno de los tratamientos, tal y como se ha descrito en el capítulo 2, se ha determinado la concentración de hierro en las hojas, en el tallo y en las raíces.

Análisis de las hojas.

En la figura 53 se muestran los valores de la concentración de hierro en las hojas de maíz en dos puntos temporales del ensayo así como los respectivos errores estándar, los cuales dan una idea de cuán precisa es la medición de un determinado parámetro en las muestras del experimento. El hierro del quelato comercial es acumulado en las hojas de las plantas mucho más rápido que el hierro complejado en el nuevo producto o el hierro sin complejar, ya que se aprecia un valor superior de concentración de hierro a los 13 días. En cambio, con el fertilizante nuevo desarrollado en este trabajo se consigue una mayor asimilación por los cultivos que en el resto de tratamientos, lo cual se observa después de 30 días de crecimiento del cultivo. Considerando conjuntamente la rapidez en la absorción y la concentración de hierro presente en las plantas, es la mezcla del producto comercial y el nuevo fertilizante con la que se observan mejores resultados en cuanto a la nutrición férrica.

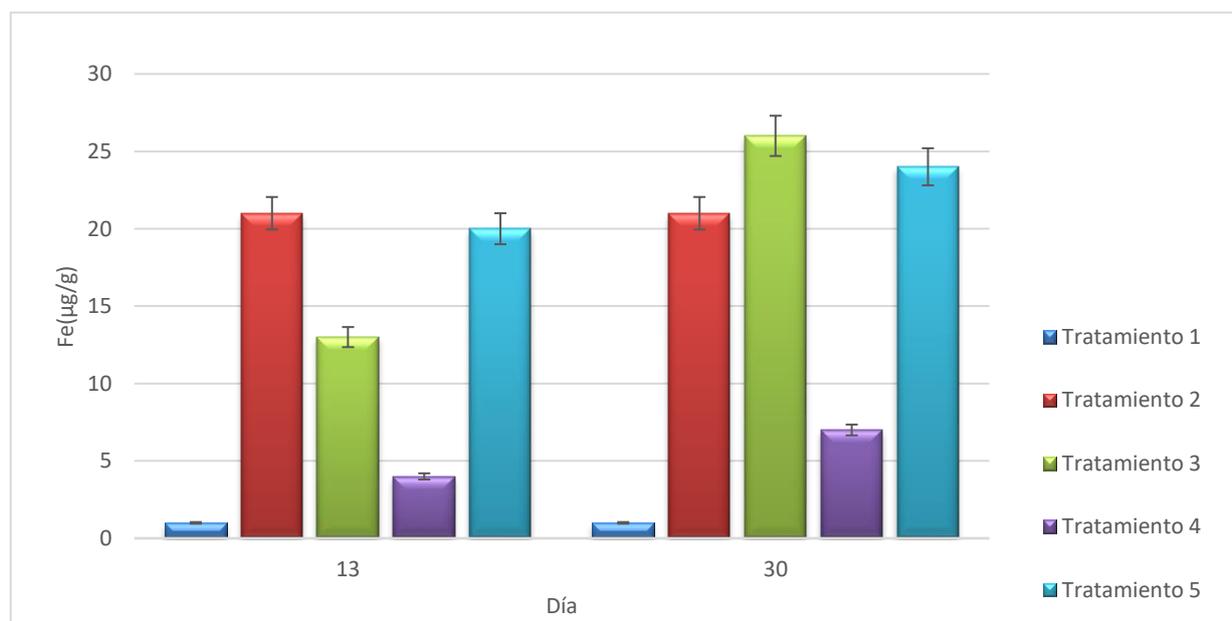


Figura 53. Concentración de hierro en las hojas en función del tiempo para los diferentes tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

Análisis del tallo.

De manera similar que en el análisis de las hojas, se midió la concentración de hierro en tallos, con objeto de obtener una trazabilidad completa del hierro en la parte aérea de la planta. En la figura 54 se muestra la concentración de hierro en el tallo. El quelato sintético y la mezcla de este con el nuevo producto son los tratamientos más rápidos a la hora de aumentar el contenido en hierro de los tallos. No obstante, la segunda proporciona mayor cantidad de hierro al final del ensayo.

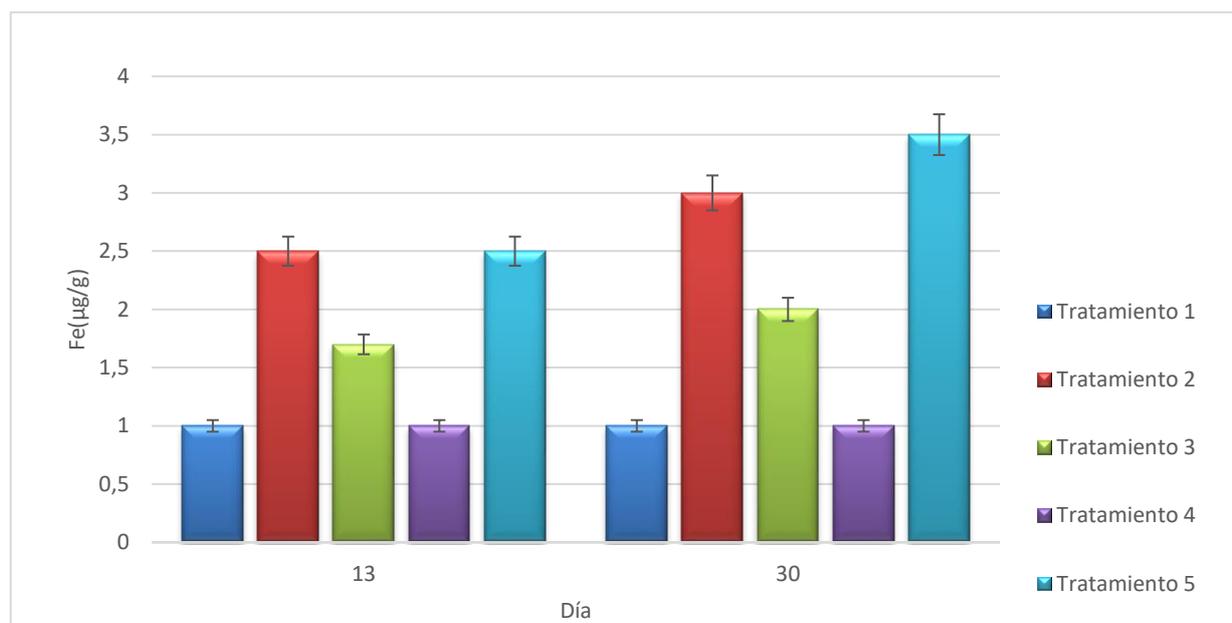


Figura 54. Concentración de hierro en el tallo. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

Análisis de raíces.

Finalmente, también se midió la concentración de hierro en las raíces de las plantas crecidas en el ensayo hidropónico, con la finalidad de determinar posibles diferencias en el efecto de los productos en cuanto a la distribución del hierro absorbido por las mismas. La toma de muestras se llevó a cabo en dos puntos temporales, de la misma manera que en el caso de la medición de concentración de hierro en tallo y hojas (día 13 y día 30). Tras los primeros 13 días, la concentración de hierro en las raíces de las plantas tratadas con el quelato comercial fue similar a la de las plantas sometidas al tratamiento con el nuevo complejo basado en sustancias húmicas e inferior a la obtenida con la combinación de ambos (figura 55). No obstante, en las muestras tomadas el día 30, las plantas tratadas con el nuevo fertilizante desarrollado en este trabajo alcanzan el mismo valor de concentración que el obtenido con la mezcla del nuevo producto y el quelato sintético comercial.

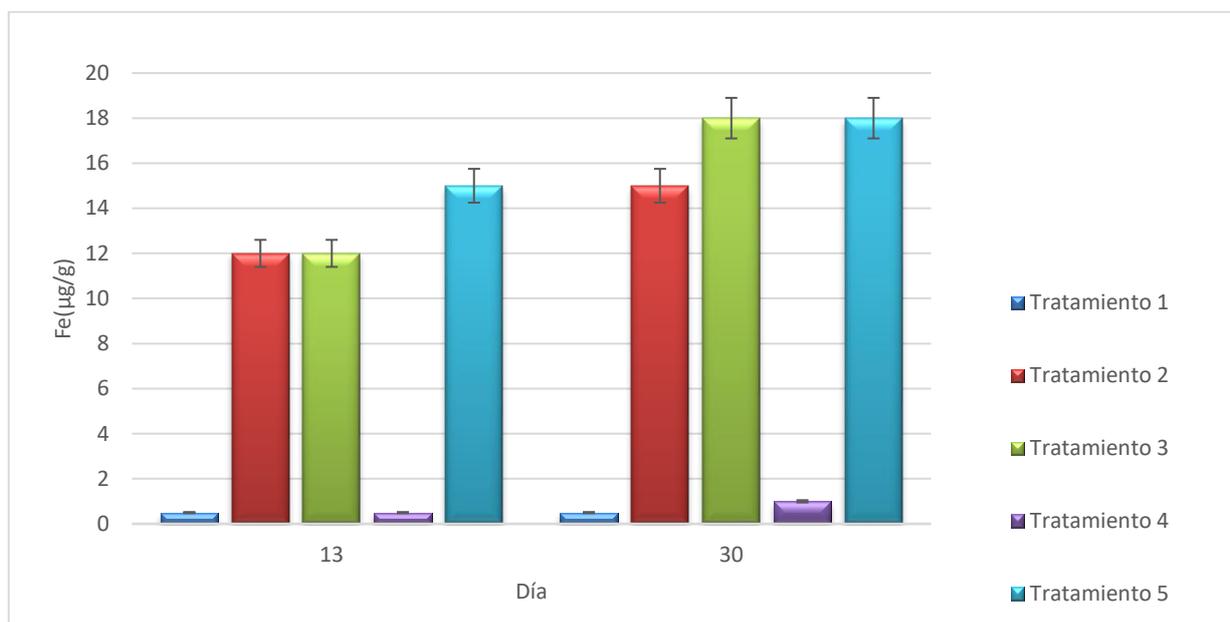


Figura 55. Concentración de hierro en las raíces. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3).

La acumulación observada de hierro en las raíces de plantas tratadas con el nuevo producto, comparable tras 13 días a la que se produce con quelato comercial y superior a esta tras 30 días, es de notable importancia, puesto que el hierro radicular, una vez absorbido y acumulado, puede actuar como reservorio para toda la planta.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en el análisis de hierro en diferentes órganos de la planta indican que el con el producto desarrollado en este trabajo tiene una velocidad de asimilación menor que el quelato comercial, pero que la combinación de ambos tratamientos mejora significativamente tanto la velocidad de absorción y traslocación (acumulación tras 13 días) como la concentración final (tras 30 días) de hierro en las plantas respecto a la aplicación del quelato únicamente. Si bien el hierro asimilado por las plantas bajo tratamiento con el producto basado en hierro complejado obtenido en este trabajo muestra una traslocación más lenta hacia las partes aéreas, la concentración final en las plantas muestra unos niveles superiores tras 30 días a las del quelato comercial tanto en raíces como en hojas, por lo que se concluyó que este nuevo producto podría aplicarse como tratamiento preventivo de deficiencias férricas.

3.3.2.-ENSAYO EN CAMPO

3.3.2.1.- Introducción

Como se ha mencionado previamente, se realizaron ensayos en campo con la finalidad de estudiar el efecto del nuevo producto en condiciones de aplicación reales y comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos en los ensayos de cámara de cultivo. En los ensayos en campo con un cultivo de berenjena, los tratamientos aplicados fueron los siguientes:

- Testigo, control sin tratamiento, denominado **Tratamiento 1**.
- Quelato comercial (LibFer), o quelato sintético, denominado **Tratamiento 2**.
- Nuevo fertilizante, o complejo natural, denominado **Tratamiento 3**.

Se analizaron los parámetros siguientes: absorción del hierro, absorción de otros micronutrientes en presencia de las sustancias húmicas aportadas por el nuevo fertilizante en comparación con los otros tratamientos que no contienen ácidos húmicos ni fúlvicos, con la aplicación de una mezcla de 5 micronutrientes a diferentes concentraciones (cinc, cobre, manganeso, boro, sodio y molibdeno), el contenido en clorofila, los parámetros de producción y por último una comparativa del uso de los dos tratamientos.

3.3.2.2.- Resultados de los ensayos en campo

Características fisicoquímicas del suelo.

Para poder llevar a cabo la validación de los resultados es necesario conocer el punto de partida del suelo sobre el que se va a desarrollar el cultivo, por lo que se efectuó un análisis fisicoquímico completo del mismo.

Los análisis para determinar las características fisicoquímicas del suelo utilizado fueron realizados en el laboratorio del departamento de I+D+i de la Empresa FERTINAGRO BIOTECH, ubicado en Utrillas, siguiendo la metodología mostrada en la tabla 14 del apartado 2.2.5. A continuación, se muestran los valores obtenidos para el suelo en El Ejido (Almería), donde se realizó el ensayo, así como un rango de valores óptimo de fertilidad de cada parámetro (tabla 35).

Tabla 35. Características físico-químicas del suelo.

Parámetro	Metodología	Resultados		Nivel óptimo
pH (extracto 1:2,5)	Electrometría	8,35	unidades de pH	6,4-7,5
Conductividad 25°C (extracto 1:5)	Conductimetría	0,272	dS/m	<0,4
Nitrógeno total	Kjeldhal	0,086	%	0,11-0,22
Nitrógeno amoniacal	Fotometría	27	mg/kg	5-10
Materia orgánica	Calcinación	1,37	%	2,0-2,5
Carbono orgánico	Cálculo aritmético	0,79	%	1,4-1,8
Relación C/N	Cálculo aritmético	9,2		9-11
Fósforo asimilable	Gravimetría	118,6	mg/kg	22-30
Potasio asimilable	Gravimetría	491,5	mg/kg	150-300
Calcio asimilable	ICP-OES	1.183	mg/kg	2000-4000
Magnesio asimilable	ICP-OES	300,2	mg/kg	300-600
Carbonatos totales	Calcimetría	42,4	%	10-20
Caliza activa	Valoración redox	10,2	%	<6
Capacidad Intercambio Catiónico (C.I.C)	ICP-OES	12,1	meq/100g	13-25
Potasio cambiable	ICP-OES	1,26	meq/100g	0,30-0,75
Calcio cambiable	ICP-OES	6,25	meq/100g	6,0-14,0
Magnesio cambiable		2,47	meq/100g	1,0-3,0
Sodio cambiable	ICP-OES	2,12	meq/100g	0,3-0,8
Cobre	ICP-OES	0,5	mg/kg	>1
Hierro	ICP-OES	9,9	mg/kg	2,5-4,5
Manganeso	ICP-OES	5,1	mg/kg	20-50
Cinc	ICP-OES	2,3	mg/kg	>0,5
Porcentaje de sodio intercambiable	Cálculo aritmético	17,5	%	<15
Textura	Aerometría	53,5	Arena %	
		18,9	Limo %	
		26,6	Arcilla %	

En cuanto al contenido en micronutrientes del suelo, los niveles de hierro y cinc se encuentran por encima de los valores mínimos, mientras que el manganeso y el cobre se encuentran por debajo. Las características del suelo, con un valor de pH de 8,35 y un porcentaje de caliza activa de 10,2, son adversas para la solubilidad de micronutrientes como el hierro y su disponibilidad para los cultivos. En suelos con pH básico, los metales se encuentran en forma de hidróxido y en un estado de oxidación que impide a la planta disponer de ellos. Asimismo, la caliza activa afecta negativamente a la absorción de micronutrientes, en especial a la del hierro.

Por lo tanto, para una correcta absorción y asimilación de los micronutrientes, en este caso del hierro, en un cultivo en el que se pretenden conseguir altas productividades, resulta esencial aplicarlo de forma protegida a través de un quelato o un producto basado en hierro complejado.

Análisis de absorción de hierro.

En la figura 56 se muestran los resultados de la absorción del hierro en función del tiempo tras la aplicación de los tratamientos para los tres ensayos realizados. Para determinar la absorción del hierro se han efectuaron dos muestreos sobre muestras de planta completa, el primero a los 45 días de la aplicación y el segundo a los 90 días.

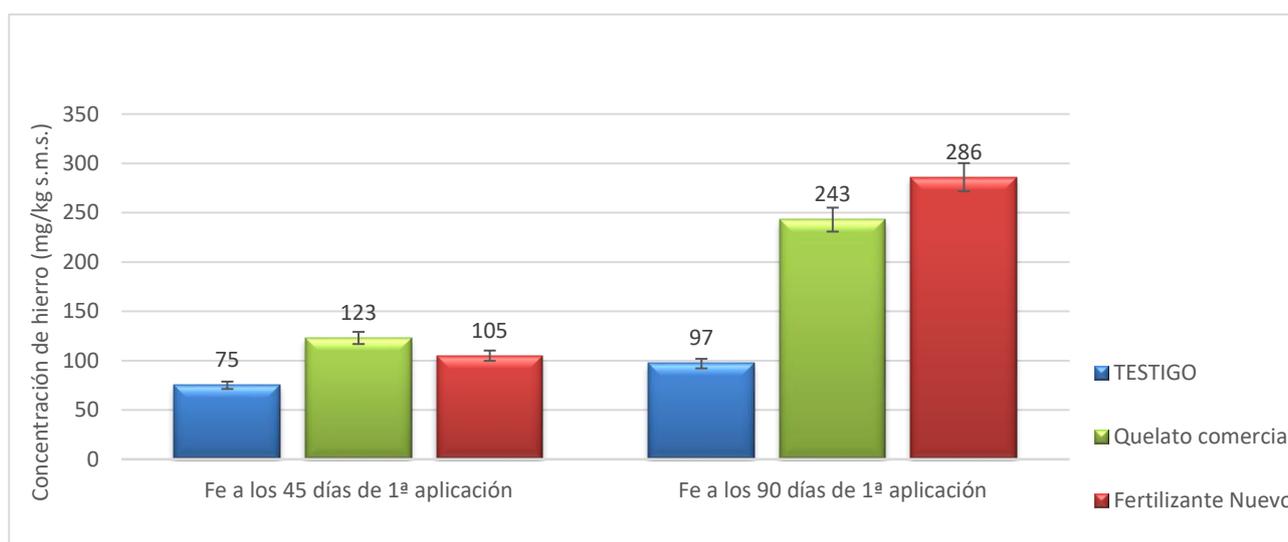


Figura 56. Absorción de hierro. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

Transcurridos 45 días después de la aplicación, el contenido en hierro en las plantas de berenjena fue superior bajo la aplicación del quelato comercial, situación similar a la observada en el experimento en la cámara de cultivo. En el segundo muestreo, tras 90 días, la concentración de hierro en planta es superior con el nuevo fertilizante respecto al quelato comercial. Estos resultados muestran coherencia con los obtenidos en la fase de cámara de cultivo, mostrando el nuevo fertilizante una menor velocidad de asimilación que el quelato comercial, pero favoreciendo una mayor acumulación de hierro tras periodos largos de crecimiento del cultivo. Los contenidos en hierro de las plantas analizadas en el ensayo en campo muestran niveles superiores de hierro respecto a las de la cámara de cultivo, lo que se explica por tratarse de cultivos diferentes y porque

en el ensayo en campo la planta fue crecida durante más tiempo y cuenta con más espacio para el crecimiento radicular.

Absorción de micronutrientes.

Se aplicaron (junto al complejo de hierro) otros 6 micronutrientes. Para determinar posibles efectos de la aplicación de los productos sobre la asimilación de estos micronutrientes, se determinó el contenido de estos en las plantas. Los micronutrientes y dosis aplicadas fueron los adecuados considerando el tipo de suelo y el cultivo:

- Cinc: 40 mg/kg.
- Cobre: 20 mg/kg.
- Manganeso: 100 mg/kg.
- Boro: 50 mg/kg.
- Sodio: 200 mg/kg
- Molibdeno: 5 mg/kg

El muestreo se realizó de la misma manera que en el caso anterior, sobre la planta completa, en dos puntos temporales, a los 45 y a los 90 días de la aplicación, realizada en paralelo a cada uno de los fertilizantes a ensayar (LibFer y Nuevo Fertilizante).

En las figuras 57 y 58 se muestran los resultados obtenidos tanto a los 45 días como a los 90 días.

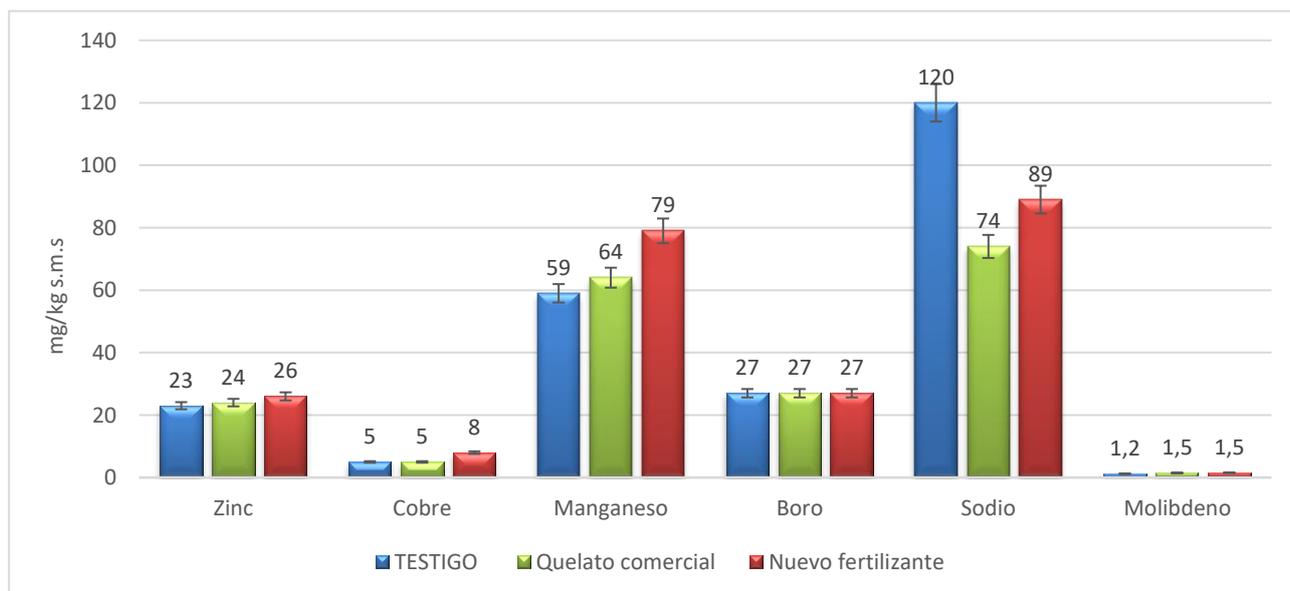


Figura 57. Absorción de micronutrientes a los 45 días de aplicación. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

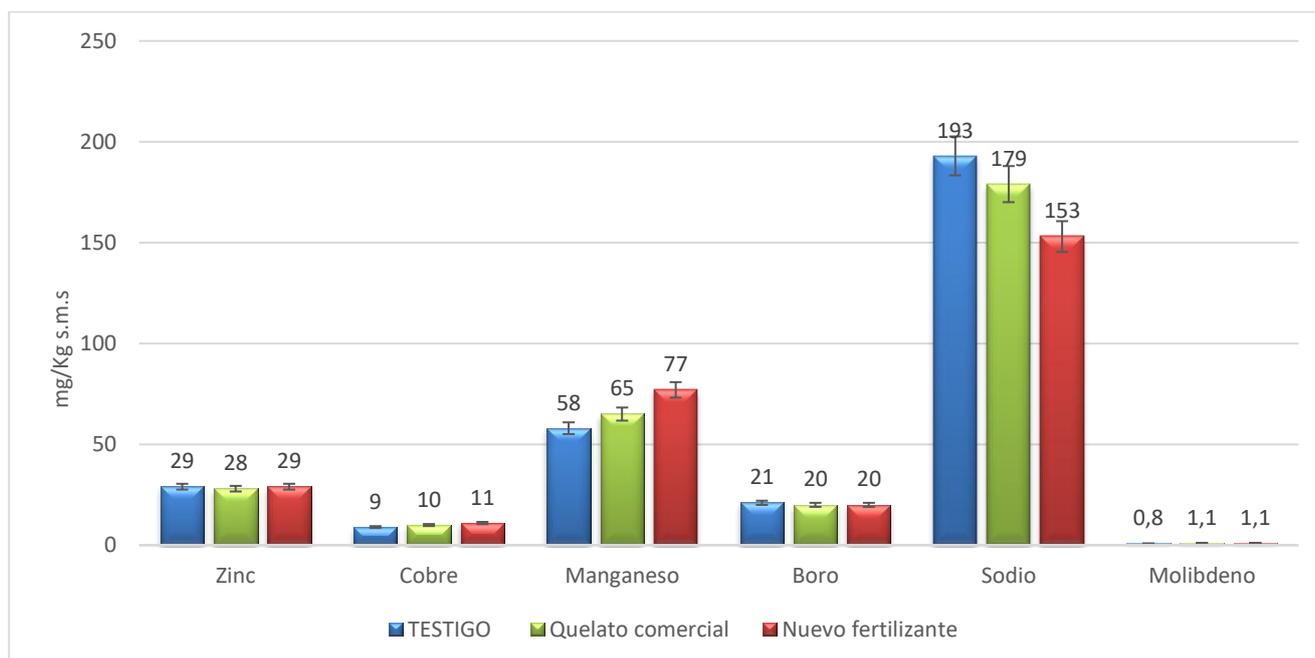


Figura 58. Absorción de micronutrientes a los 90 días de aplicación. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

La aplicación del nuevo producto basado en sustancias húmicas provoca aumentos en la absorción de cobre y manganeso, mientras que produce una disminución en cuanto a los niveles de sodio. Estos resultados sugieren que las sustancias húmicas aplicadas en el nuevo producto tienen un efecto positivo sobre la asimilación de determinados micronutrientes, mientras que en el caso de un catión tóxico y causante de salinidad como el sodio su asimilación es menor. Posiblemente, la reducción en la absorción de sodio se deba al aumento de capacidad de intercambio catiónico del suelo que proporcionan las sustancias húmicas aplicadas con el nuevo producto, captando el sodio y disminuyendo la capacidad del cultivo para absorberlo. Asimismo, sucede lo mismo con el molibdeno que sufre un incremento de un 20%, en cambio como se observa para el zinc y boro estos no sufren ninguna modificación al aplicar ninguno de los tratamientos.

Contenido en clorofila.

El análisis del contenido en clorofila se efectuó mediante un analizador no destructivo: el medidor de clorofila SPAD 502. Las unidades de medición son $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ también denominadas unidades SPAD, que da un índice de clorofila en la planta. Los muestreos se han llevado a cabo en 4 fechas de muestreo: aplicación, a los 45 días después de la aplicación, los 90 días y en la recogida del producto.

Como puede verse en la figura 59, no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos y el testigo, si bien, sí se observó una tendencia a aumentar el contenido en clorofila en las plantas tratadas con el nuevo fertilizante.

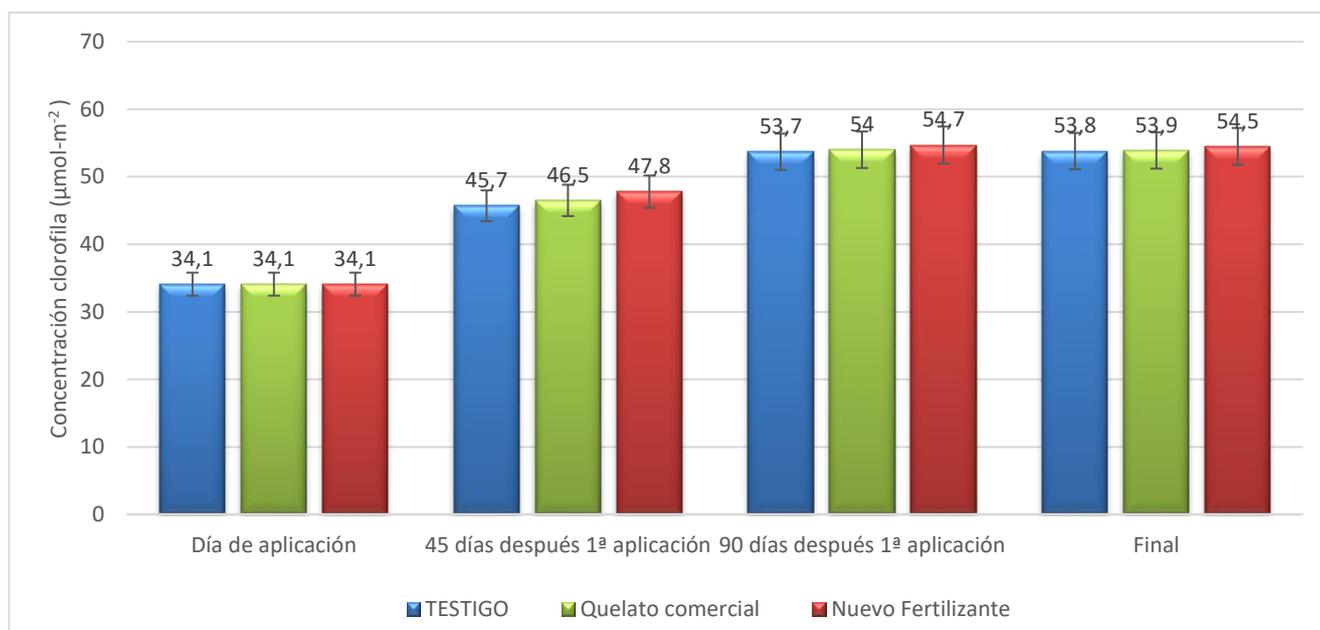


Figura 59. Contenido en clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$). Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)

La tendencia a una mayor síntesis de clorofila bajo el tratamiento con el nuevo fertilizante podría explicarse por el efecto conjunto de una asimilación mayor de hierro junto al efecto positivo de las sustancias húmicas en la asimilación de otros nutrientes por parte de los cultivos.

Producción mensual de ambos tratamientos.

Se estudiaron los rendimientos en la producción de la berenjena bajo los diferentes tratamientos. Es importante remarcar que la superficie de ensayo para el tratamiento testigo fue menor que con los tratamientos en base al quelato de hierro y al nuevo fertilizante ya que era previsible que el primero causase mermas importantes en la productividad que afectasen económicamente al productor que facilitó las parcelas para los ensayos.

Los resultados obtenidos en cuanto a producción mensual se muestran en la figura siguiente:

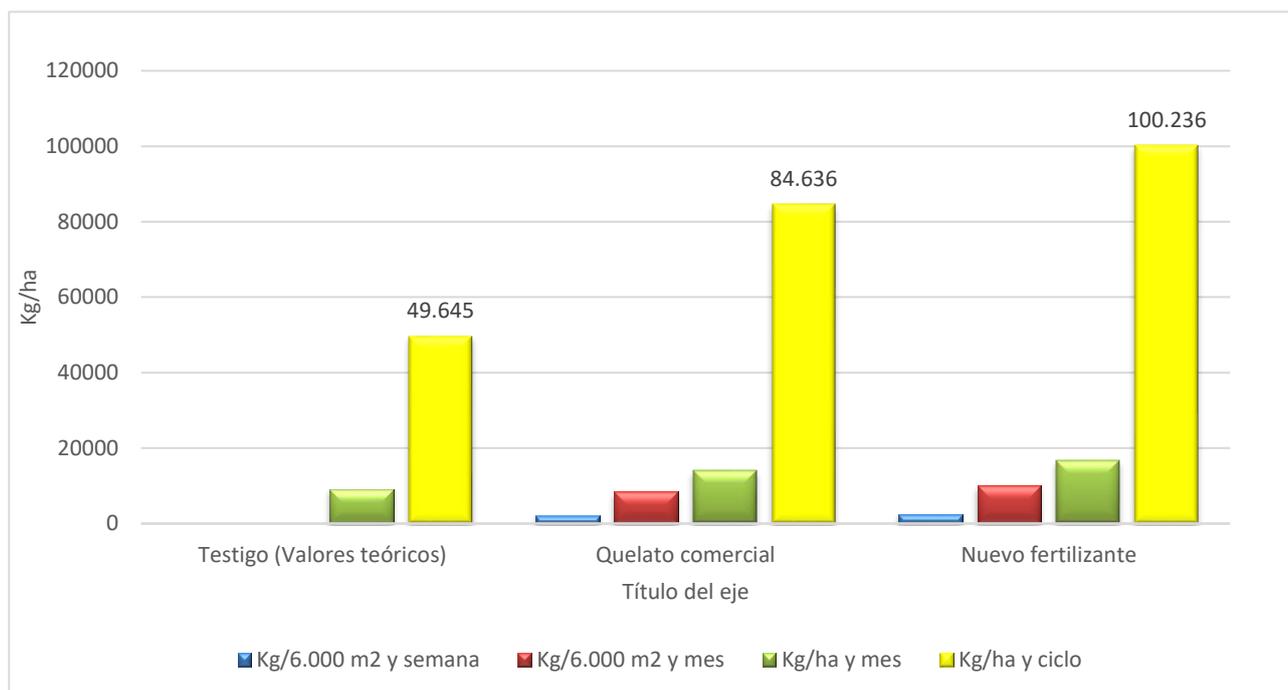


Figura 60. Producciones medias por corte y semana a partir de enero de 2017.

Los resultados muestran una mayor producción en las plantas tratadas con el nuevo fertilizante respecto al quelato comercial. Los incrementos en la asimilación de hierro y otros micronutrientes, el aumento en contenido en clorofila y la disminución de los niveles de sodio observados bajo el tratamiento con el nuevo fertilizante sugieren que la mayor producción se debe a un efecto positivo de este nuevo producto respecto a un quelato comercial convencional, especialmente en cuanto a la nutrición férrica.

Análisis de beneficio económico por hectárea

Para finalizar la interpretación de los resultados del ensayo, se realizó un análisis de beneficio económico por hectárea para cada tratamiento aplicado. Se consideró un precio de 0,36 €/kg de berenjena, precio de referencia en la zona para la fecha de la recolección.

Tabla 36. Análisis de la rentabilidad de la aplicación para el precio medio de venta de la berenjena a 0,36 €/kg desde enero de 2017.

	Kg/ha	€/ha
LibFer	84.636	30.468,96
Nuevo Fertilizante	100.236	36.084,96
	BENEFICIO (€/ha)	

Los datos muestran un incremento en el beneficio por hectárea para el agricultor de en torno el 20% en comparación frente al quelato comercial.

Conclusiones del ensayo en campo

El ensayo en campo se ha realizado en las condiciones reales de un cultivo de interés agronómico sensible a las carencias de hierro comparando dos correctores férricos, un quelato comercial convencional (LibFer) y un producto basado en sustancias húmicas complejadas obtenido en este trabajo.

Las conclusiones a los ensayos en campo son las siguientes:

- Se consiguió incrementar la producción en el sector tratado con el nuevo fertilizante respecto al tratado con quelato comercial en un 18,43%. Los resultados obtenidos sugieren que el incremento en producción puede deberse a un efecto conjunto de una mejor nutrición férrica unida a una mayor asimilación de otros nutrientes debido a la presencia de sustancias húmicas.
- Ni en el tratamiento con el quelato comercial ni en el tratamiento con el nuevo producto se ha observado clorosis férrica, estando en todo momento los niveles de hierro dentro de los valores considerados como normales (mayor de 100 mg/kg s.m.s.) para el cultivo de berenjena en invernadero.
- Se ha observado una tendencia a una mayor cantidad de clorofila en el cultivo en el que se ha aplicado Nuevo Fertilizante respecto al LibFer. En concreto, la media del contenido en clorofila en el nuevo producto respecto al convencional es un 4% mayor. Esto sugiere que las plantas que recibieron el tratamiento con el nuevo fertilizante tienen una mayor actividad fotosintética.
- La absorción de hierro con el nuevo fertilizante aumentó un 17% respecto al LibFer .
- El producto desarrollado en este trabajo en base a sustancias húmicas ha contribuido a movilizar cobre, manganeso y molibdeno.
- El nuevo fertilizante ha contribuido a disminuir los efectos de la sodicidad, al reducir la presencia de sodio en planta en un 20% a los 90 días de la aplicación

CAPÍTULO 4

4.1.- RESUMEN Y CONCLUSIONES GENERALES

La investigación realizada en esta tesis doctoral ha permitido examinar los procesos de extracción de sustancias húmicas a partir de carbón y de activación de las mismas para aumentar su capacidad de complejación. A través de dicha investigación ha sido posible determinar la viabilidad y potenciales beneficios de las sustancias húmicas activadas como materia prima para la fabricación de fertilizantes ecológicos y desarrollar un nuevo fertilizante con metales complejados.

Si bien el uso de sustancias húmicas ha sido extensamente analizado en el pasado, el proceso de extracción a partir de carbón es mucho menos conocido, a pesar de que nuevos usos del carbón podrían presentar grandes beneficios para la sociedad, teniendo en cuenta el abandono de su uso como fuente de energía en las zonas mineras. Además, la extracción de sustancias húmicas a partir de carbón presenta algunas particularidades beneficiosas respecto otros procesos de obtención de sustancias húmicas como son el aprovechamiento de una fuente origen natural frente o la circularidad económica en el proceso de extracción. En este trabajo se han desarrollado dos procedimientos industriales, uno para la extracción de sustancias húmicas a partir del carbón y otro para la activación de las mismas con la finalidad de aumentar su capacidad de complejación de micronutrientes. Ambos procedimientos han sido patentados (WO2018/073463 y WO2018/015586) y se ha obtenido un nuevo producto fertilizante, actualmente utilizado por Fertinagro Biotech para la corrección de clorosis férrica en los cultivos.

En este capítulo se resumen los principales resultados derivados de cada una las fases del presente trabajo, así como las conclusiones globales que estos han permitido extraer.

4.1.1.- EXTRACCIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS

En primer lugar, se realizó un estudio del estado del arte sobre la naturaleza de las sustancias húmicas y las ventajas de sus diferentes usos, haciendo especial énfasis en los agrícolas. El uso de las sustancias húmicas en la agricultura viene de tiempo atrás, ya que la aplicación de materias orgánicas y sustancias húmicas correlacionaba con mejoras en la calidad y cantidad de las cosechas, aun cuando no se podía explicar con precisión las causas de dichas mejoras. El porqué de ese beneficio siempre ha sido achacado a la mejora de la calidad de suelo, sin embargo, no se había profundizado en la compleja estructura de las sustancias húmicas y sus funciones.

La presente investigación se ha llevado a cabo en las instalaciones que Fertinagro tiene en Utrillas, zona tradicionalmente minera, y empleando carbón de la zona de las Cuencas Mineras de Teruel.

Los experimentos preliminares demostraron que se obtenían extractos húmicos tras un tratamiento del carbón con un agente oxidante. Las sustancias húmicas obtenidas por oxidación a partir del carbón contienen ácidos húmicos y fúlvicos de naturaleza similar a los obtenidos por procesos naturales y los procesos experimentales de laboratorio, si bien existen dificultades adicionales que se tuvieron que afrontar para poder implementar el proceso a nivel industrial, identificando los siguientes puntos críticos:

- Agente oxidante a utilizar en la reacción. Este debe de ser una sustancia carente de peligrosidad tanto a nivel industrial como a nivel medioambiental, ya que en muchos trabajos propuestos en laboratorio se utilizan solventes que no se pueden emplear a nivel industrial.
- Los tiempos de reacción para la obtención de las sustancias húmicas, debiéndose buscar el equilibrio entre coste y rendimiento del proceso.
- Tamaño de partícula. Este puede tomar un papel relevante si no es el adecuado, ya que no se daría una reacción de extracción completa, reduciendo el rendimiento con el mismo tiempo de ejecución.

Al margen de estos aspectos operacionales que se tuvieron en cuenta en el proceso de optimización, hay que reseñar que en la bibliografía se describen procesos de extracción a nivel de laboratorio donde el principal objetivo es la selectividad de los ácidos húmicos y fúlvicos frente a la reducción del tiempo de proceso que junto con el porcentaje de extracción es el objetivo en las patentes estudiadas en este trabajo.

En este trabajo se han estudiado las opciones de empleo de diferentes solventes descritos en bibliografía, pero teniendo en cuenta que el proceso tenía que ser industrializable. Por ello se optó por utilizar el peróxido de hidrógeno como agente extractante sobre el carbón, que previamente había sido tratado para la reducción de su tamaño de partícula. Se han conseguido extractos de hasta un 80% de contenido en masa además de la obtención de la patente IMPROVED PROCEDURE OF EXTRACTION OF HUMIC SUBSTANCES FROM COAL, con número de referencia WO2018/073463 pendiente de la concesión.

El proceso desarrollado consta en primer lugar de un cribado de las sustancias húmicas tras molturación en fase sólida, para ya posteriormente llevar a cabo una molturación en fase líquida pasando de un tamaño de partícula de 4,5 mm a 1,7 mm. Posteriormente se realiza un tratamiento mediante ultrasonidos, llegando a un tamaño de partícula de 0,02 mm. En este punto el carbón ya tiene el tamaño adecuado para ser oxidado

por medio de peróxido de hidrógeno y ser sometido a radiación visible para potenciar con el efecto fotoeléctrico la oxidación del carbón, y así, por lo tanto, su transformación en sustancias húmicas.

4.1.2.- ACTIVACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS PARA LA POTENCIACIÓN DE LA COMPLEJACIÓN DE MICRONUTRIENTES.

Las sustancias húmicas, además de la capacidad de mejorar las características físicas del suelo, pueden complejar metales como el hierro, cinc, manganeso, etc. En mayor o menor medida, los cultivos agrícolas requieren de diferentes cantidades de micronutrientes en función de la fase de crecimiento y condiciones ambientales. Si las plantas no consiguen las cantidades de micronutrientes que necesitan, estas sufren carencias que pueden provocar disminuciones de rendimientos y calidad de las cosechas, e incluso la muerte de la planta, si no son corregidas.

Por otra parte, la adición de estos micronutrientes al suelo y su absorción por las plantas no es tarea fácil, ya que existen condicionantes, como el pH del suelo, que pueden bloquear el micronutriente en el suelo e impedir su absorción por las mismas. En este trabajo se ha buscado una nueva solución, utilizando las sustancias húmicas como agentes complejantes de micronutrientes. En la actualidad existen en el mercado sustancias sintéticas que realizan la función de proteger al metal en el suelo y que la planta pueda disponer de él, pero no son aptas para la agricultura ecológica. La vida media de estas sustancias sintéticas es muy alta y quedan depositadas en el suelo reteniendo otros metales.

Por todo esto en este trabajo se ha realizado un estudio estadístico, basado en el diseño de experimentos para evaluar los factores que afectan en la complejación conjunta del hierro, manganeso y zinc. Estos factores han sido:

- La concentración de sustancias húmicas.
- El tamaño de partícula.
- El pH en la primera fase como en la segunda.
- El tiempo de reacción en ambas etapas.
- La temperatura.
- La concentración de micronutriente a complejar.

El proceso consiste en la mezcla de una concentración conocida de sustancias húmicas (entre un 10 y un 40%) con una concentración de hierro, manganeso y zinc. Previamente las sustancias húmicas son molturadas a

diferentes tamaños para determinar el efecto del tamaño de partícula sobre la complejación, en un rango de tamaño entre 10 μm y 700 μm . En una primera etapa, se lleva a cabo la reacción a un pH entre 8 y 11, durante un tiempo entre 1 y 48 horas a una temperatura entre 15°C y 75°C.

Una vez transcurrida la primera reacción, se modifica el pH en una segunda reacción (pH entre 11 y 14), durante un tiempo también de entre 1 y 48 horas y una temperatura de reacción entre 15°C y 75°C.

Los resultados obtenidos muestran que la complejación del hierro previa activación es viable, llegando a valores de hasta un 70% de hierro complejado. Teniendo en cuenta que el proceso de complejación se lleva a cabo en gran parte en la primera reacción, tal y como muestra el estudio estadístico, los factores de pH y tiempo en la primera reacción son los que más afectan al proceso junto a la concentración inicial de sustancias húmicas y la concentración inicial de micronutriente en la cantidad de metal complejado.

Para el manganeso, el porcentaje de complejación no alcanza valores superiores al 45% y los factores que influyentes en el porcentaje de complejación son el pH de la primera reacción y el tiempo de la misma junto con la concentración inicial de manganeso.

Por último, para el cinc, no se han obtenido resultados concluyentes sobre los factores de influencia para la complejación, ya que el estudio concluía que ninguno de los factores tenía significancia estadística. Las posibles causas son:

- Que el rango de los factores seleccionado queda fuera de los que el cinc necesita.
- Que exista un efecto fisicoquímico del cinc en presencia de otros metales que haga que el cinc no pueda complejarse.

Tanto si el origen está en una o ambas posibles causas, es necesario continuar la investigación en el futuro.

Este proceso también ha sido patentado: METHOD FOR OBTAINING HUMIC ACIDS WITH HIGH CAPACITY FOR COMPLEXING METAL IONS AND PRODUCT OBTAINED USING SAID METHOD con número de referencia WO2018/015586, también esperando la concesión.

El nuevo fertilizante obtenido en este trabajo se denomina Topiron, que contiene hierro complejado por sustancias húmicas.

4.1.3.- ENSAYOS DE EFICACIA DEL NUEVO FERTILIZANTE

En un primer momento se efectuaron pruebas en cámara de cultivo, donde se obtuvieron respuestas en un periodo breve de tiempo, analizándose el contenido en hierro en plantas de maíz sometidas a un ensayo que combina cultivo hidropónico y crecimiento en tiesto. Los resultados en cámara de cultivo demostraron que el producto diseñado en este trabajo tenía la capacidad de corregir la carencia del hierro al mismo nivel que un quelato sintético, aunque la respuesta sea más lenta en el primero.

Una vez validado el producto en cámara de cultivo, se realizó un ensayo en campo con cultivo de berenjena, comparando un control sin tratar, un tratamiento con un quelato sintético y un tratamiento con el nuevo producto. Los resultados demuestran que el nuevo fertilizante basado en sustancias húmicas es más eficiente en la corrección de la carencia de hierro con un aumento sobre el control de hasta tres veces y un 17% sobre el quelato comercial, aumentando además un aumento en la productividad de más de un 18% sobre el quelato sintético.

4.2.- CONTRIBUCIONES PRINCIPALES DE LA INVESTIGACIÓN.

De acuerdo con lo expuesto, se considera alcanzado el objetivo principal de la investigación, ya que se ha establecido de forma real la viabilidad y la aplicación de la transformación de carbón en sustancias húmicas así como la potenciación de las mismas para aumentar la capacidad de complejación de metales, mediante dos métodos patentados y aplicados industrialmente. Este proceso ha finalizado con la obtención y validación de un producto comercial. Además de estas aportaciones, durante la ejecución de la investigación se destacan algunas contribuciones adicionales:

- El estudio de diferentes solventes con capacidad oxidativa ayuda a una oxidación del carbón de forma controlada y sin utilizar solventes peligrosos tanto para el uso a nivel industrial como para el medioambiente.
- La adecuación y utilización de técnicas de ultrasonidos, así como el efecto fotoeléctrico, potencian la transformación del carbón en sustancias húmicas.

- En la complejación conjunta de metales por medio de sustancias húmicas se debe de contemplar no solo los factores que influyen en la reacción de complejación, sino también factores fisicoquímicos del metal a complejar.
- Los rangos de los factores de reacción no son extensibles para todos los metales, aun siendo metales cercanos en la tabla periódica.
- Las sustancias húmicas además de ser compuestos biodegradables y de aportar materia orgánica, pueden ser utilizadas como agente complejante para metales, llegando a complejar hasta un 70% en el caso del hierro.

4.3.- PERSPECTIVAS FUTURAS

Esta investigación se ha centrado en uno de los problemas a los que la agricultura se va a enfrentar en el futuro cercano: la necesidad de un aumento en su sostenibilidad y la aparición previsible de restricciones en la aplicación de productos sintéticos por cuestiones ambientales y de seguridad alimentaria. Este trabajo ha aportado dos soluciones, la primera para la obtención de sustancias húmicas como materia prima para fertilizantes y la segunda en forma de un nuevo fertilizante con alta capacidad de complejación para metales como el hierro. Sin embargo, para que estas tecnologías puedan aplicarse ampliamente tanto para la transformación del carbón como la complejación efectiva de otros micronutrientes como el manganeso y el zinc, es preciso continuar investigando. A continuación, se resumen algunas de las líneas que quedan abiertas de cara a continuar avanzando en la complejación de nutrientes con sustancias húmicas.

- Algunos de los equipos utilizados a nivel de laboratorio-planta piloto, quedan fuera del alcance del proceso industrial como es el sonicador y las lámparas de luz visible, por la alta potencia necesaria y por lo que supondría su coste de instalación y mantenimiento, por dicho motivo se ha de seguir buscando como mejorar dicha técnica o una sustitución que sea igual de efectiva.
- Desarrollar un diseño experimental más profundo, una vez en este trabajo se han analizado los factores más influyentes y acotado los rangos de trabajo para poder obtener altos porcentajes de complejación con los tres metales (Fe, Mn y Zn).

- El uso conjunto de micronutrientes complejados con sustancias húmicas. Por ello, convendría estudiar esto más en detalle, incluyendo una investigación sobre el comportamiento atómico de los diferentes metales en presencia de otros frente a las sustancias húmicas, como sucede con el cinc frente al hierro y el manganeso en presencia de sustancias húmicas.
- Por último, sería positivo realizar un estudio agronómico con diferentes cultivos y en diferentes suelos, valorando el efecto de las sustancias húmicas sobre la relación suelo-cultivo, y viceversa, un mismo cultivo en diferentes tipos de suelos con la aplicación de sustancias húmicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. FAO, (2002). Los fertilizantes y su uso. FAO, Roma.
2. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations, 1998. Enfoques. Los nutrientes Vegetales. Disponible: <http://www.fao.org/ag/esp/revista/spot3.htm>. (Consultado 03/03/2018)
3. Pérez Llamas, F., Zamora Navarro, S. 2002. Nutrición y alimentación humana. EDITUM. Roots for Growth (<http://rootsforgrowth.com/>). pp. 305. (Consultado 03/03/2018)
4. Stewart, W.M., Dibb, D.W., Johnston, A.E. y Smyth, T.J. (2005). The Contribution of Commercial Fertilizer Nutrients to Food Production. *Agronomy Journal*. Vol. 97, No. 1. pp 97.
5. Morón, A., (1996). MANEJO Y FERTILIDAD DE SUELOS, Montevideo: INIA.
6. Gisladottir, G. y Stocking, M. (2005). Land Degradation Control and Its Global Environmental Benefits. *Land Degradation & Development*, pp. 99-112.
7. FAO. (2019). Food and Agriculture Organization. Degradación del Suelo. Disponible: <http://www.fao.org/soils-portal/soil-degradation-restoration/es/>.(Consultado 04/12/2019)
8. FAO, «Degradación del Suelo. Available: <http://www.fao.org/soilsportal/soil-degradation-restoration/es/>.(Consultado 03/03/2018)
9. FAO. (1972). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible: <http://www.fao.org/3/aq378e/aq378e.pdf>. (Consultado 04/03/2018)
10. Sharpley, A. (1995). Fate and Transport of Nutrients: Phosphorus. Disponible: https://www.nrcs.usda.gov/wps/portal/nrcs/detail/national/technical/nra/rca/?cid=nrcs143_014203. (Consultado 10/03/2018)
11. Baker, J. L. (2008). Understanding Nutrient Fate and Transport, Including the Importance of Hydrology in Determining Field Losses, and Potential Implications on Management Systems to Reduce *Those Losses*. USDA ARS.
12. Follett, R. F. (1995). Fate and Transport of Nutrients: Nitrogen. Fort Collins, Colorado.
13. Salvagiotti, F. (2012). Respuesta a la fertilización y eficiencia en el uso del nitrógeno en maíz de siembra tardía sobre diferentes antecesores utilizando inhibidores de ureasa. XIX Congreso Latinoamericano de la Ciencia del Suelo, Mar del Plata, Argentina.

14. Prasad, R. y Hochmuth, G. J. (2016). Environmental Nitrogen Losses from Commercial Crop Production Systems in the Suwannee River Basin of Florida. *PLoS ONE* 11(12): e0167558.
15. Litke, D. W. (1999). Review of Phosphorus Control Measures in the United States and Their Effects on Water Quality. Water-Resources Investigations Report 99-4007. Denver, Colorado.
16. Penn, C., Bell P., Carver, B., Arnall, B. y Klatt, A. (2015). Comparison of Phosphorus Use Efficiency Among Various Winter Wheat Accessions Grown in Acid and Calcareous Soils. *Journal of Plant Nutrition*. 38. 00-00. 10.1080/01904167.2015.1009103.
17. BOE. Real Decreto 261/1996 de 16 de febrero sobre protección de las aguas contra la contaminación producida por los nitratos procedentes de fuentes agrarias.
18. Schwich, G. E. A. (2011). Experiences in monitoring and assessment of sustainable land management. *Land degradation and development*, vol. 22, pp. 214-225.
19. Villarroel, R. (2000). Diagnóstico de la Fertilidad del suelo. *Centro Regional de Investigación Remehue, Instituto de Investigaciones Agropecuarias*. INIA.
20. Agegnehu, G. (2018). Soil fertility and plant nutrition management. *Soil Fertility and Plant Nutrient Management: Addis Abeba*. Ethiopian Institute of Agricultural Research (EIAR).
21. Romheld, V. (1987). Different strategies for iron acquisition in higher plants. *Physiol. Plantarum* 70, pp. 231-234.
22. Loneragan, J.F. (1997). Plant nutrition in the 20th and perspectives for the 21st century. *Plant Soil* 196, pp. 163-174.
23. Park, M. (2001). The fertilizer industry. Woodhead Publishing Ltd., Cambridge, UK. 2001. ISBN: 9781855738782.
24. Efreteui, A. (2016). The Soils Cation Exchange Capacity and its Effect on Soil Fertility. <http://nmsp.cals.cornell.edu/publications/factsheets/factsheet22.pdf>. (Consultado 23/04/2018)
25. Pratt, C. J., (1976). Fertilizantes Químicos. *Química y Ecosfera*. Madrid, Hermann Blume, p. 412.

26. Indrajit, L. (2012). Ion Exchange in Soil: Cation and Anion. *Soil management India*. <http://www.soilmanagementindia.com/soil/ion-exchange-in-soil-cation-andanion/1212>. (Consultado 23/04/2018)
27. Curie, C. and Mari, S. (2017). New routes for plant iron mining. *New Phytol*, 214, pp. 521-525. doi:10.1111/nph.14364
28. Basic soil chemistry. <https://www.dcr.virginia.gov/soilandwater/document/nmagscbsc.pdf>. (Consultado 04/03/2018)
29. Halverson, A. (2006). Nutrient-water interactions. Encyclopedia of soil science, CRC.
30. <http://ecoursesonline.iasri.res.in/Courses/Soil%20Chemistry%20Soil%20Fertility%20&%20Nutrient%20Mgmt/SSAC122/Data%20Files/lec06.pdf>. (Consultado 14/03/2018)
31. University of California Santa Cruz. (2015). Soil Chemistry and Fertility. <https://casfs.ucsc.edu/about/publications/Teaching-OrganicFarming/PDF-downloads/TOFG-all.pdf>. (Consultado 05/05/2018)
32. Barber, S. A. (1984). Soil Nutrient Bioavailability. *A Mechanisitic Approach*. New York.
33. Chang, R. (1999). Química. McGraw Hill Interamericana, México D.F ISBN 970-10-1946-6.
34. FAO. 2004. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Sustainable Land Management. <http://www.fao.org/3/a-i4593e.pdf>. (Consultado 03/08/2019)
35. What is sutainable land management. Available: <http://www.ciesin.org/lw-kmn/slm/slm.html>. (Consultado 05/05/2018)
36. Gruhn, P., Goletti, F y Yudelman, M. (2000). Integrated nutrient management, soil fertility, and sustainable agriculture: Current issues and future challenges. Food, Agriculture and the Environment Discussion Paper.
37. Shreeja, D. Integrated Nutrient Management Meaning, Concept and Goals. Soil Science. Available: <http://www.soilmanagementindia.com/soil-fertility/integrated-nutrientmanagement-inm-meaning-concept-and-goals/3184>. (Consultado 05/05/2018)

38. Moe, K., Moh, S., Htwe, A., Kajihara, Y. y Yamakawa, T. (2019). Effects of Integrated Organic and Inorganic Fertilizers on Yield and Growth Parameters of Rice Varieties. *Rice Science*. 26. 309-318. 10.1016/j.rsci.2019.08.005.
39. Zamudio G, B., TadeoR, M., Espinosa C, A., Martínez R, J., Euan, D., Roberto, V., y Esparza, J. (2015). Eficiencia agronómica de fertilización al suelo de macro nutrientes en híbridos de maíz. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 6. 1557-1569. 10.29312/remexca.v6i7.549.
40. FAO Food and Agriculture Organization of the United States. (2001). DIRECTRICES PARA ENSAYOS Y DEMOSTRACIONES DE NUTRICIÓN VEGETAL Y MANEJO DE SUELOS A NIVEL DE FINCA. Roma.
41. Grasso, A. y Diaz-Zorita, M. (2018). Fertilizar “Manual de buenas prácticas de manejo de fertilización”. Asociación Civil. Edits., Buenos Aires, p. 52.
42. Tasistro, A. (2011). Los 4 requisitos para una nutrición vegetal. International Plant Nutrition Institute.
43. Smart Fertilizing with organic matter. Available: <https://www.smartfertilizer.com/articles/organic-matter>. (Consultado 10/04/2019)
44. Berardo, A., (2004). Manejo de la fertilización en una agricultura sostenible. *Informaciones Agronómicas*, nº 23.
45. Gaskell, M., Smith, R., Mitchell, J., Koike, S. T., Fouche, C., Hartz, T., Horwath, W. y Jackson, L. (2006). Soil fertility management for organic crops. *ANR Publications* (Division of Agriculture and Natural Resources). Publication No. 7249. <https://doi.org/10.3733/ucanr.7249>
46. Fondriest Staff. (2010). The nitrogen cycle. *Environmental Monitor*. <https://www.fondriest.com/news/nitrogencycle.htm>
47. Catherine, L. (2012). The use of humic substances in agriculture origins. *Science and Applications Astute Communications*, Calgary, Alberta.
48. Pettit, R. (2008). Organic matter, humus, humate, humic acid, fulvic acid. *Chemistry*.
49. Rahman, E. (2017). Enhancing olive trees growth and productivity by using hydrogen and potassium humate under rain-fed condition in northern western coastal zone. *Egyptian. J. Desert Res.*, vol. 67, nº 1, pp. 137-151.

50. Popescu, G. Popescu, M.(2018). Yield, berry quality and physiological response of grapevine to foliar humic acid application. *Bragantia*, vol. 27, nº 2.
51. Sanli, A., Karadogan, T. y Tongu, M. (2013). Effects of leonardite applications on yield and some quality parameters of potatoes solanum. *Turkish Journal of Field Crops*, vol. 18, nº 1, pp. 20-26.
52. Mackowiak, C. L., Grossl, P.R. y Bugbee B. G. (2001). Beneficial effects of humic acid on micronutrient availability to wheat. *Soil Sci. Soc. Am. J.*, vol. 65, pp. 1744-1750.
53. Fageria, N. K. y Knupp, A. M. (2013). Upland rice phenology and nutrient uptake in tropical climate. *Journal of Plant Nutrition*, vol. 36, nº 1, pp. 1-14.
54. Sania, B. (2013). Foliar Application of Humic Acid on Plant Height in Canola. 3rd International Conference on Asia Agriculture and Animal (ICAAA 2013).
55. Helmy, Y. y Omar N. M, (2017). Effect of spraying or ground drench from humic acid on growth, total output and fruits nutritional values of cucumber (*Cucumis sativus* L.) grown under plastic house conditions. *Chemical Science Review and Letters*, vol. 6, nº 21, pp. 581-584.
56. Virgine T, J. S. y Singaram P. (2007). Influence of humic acid application on yield, nutrient availability and uptake in tomato. Coimbatore: Tamil Nadu Agricultural University.
57. Hoang, L. y Böhme, M. (2001). Influence of humic acid on the growth of tomato in hydroponic systems. *Acta Horticulturae*. 548. 451-458. 10.17660/ActaHortic.2001.548.53.
58. Yildirim, E. (2007). Foliar and soil fertilization of humic acid affect productivity and quality of tomato. *Acta Agriculturae Scandinavica*, Section B. Soil & Plant Science, vol. 57, nº 2, pp. 182-186.
59. David, P.P., Nelson, P.v. and Sanders, D.C. (1994). A humic acid improves growth of tomato seedling in solution culture. *J. Pl. Nutr.*,17(1). p. 173-184.
60. Amaya, L. A., (2017). Comportamiento de Algunos Compuestos Orgánicos e Inorgánicos en la Calidad de la Fresa. *Agrícola y Ambiental*.
<http://repositorio.uaaan.mx:8080/xmLui/handle/123456789/42215>.
61. Savita, S. P. y Girijesh, G. K. (2018). Effect of humic substances on nutrient uptake and yield of soybean. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, vol. 8, nº 2, pp. 2167-2171.

62. Ennab, H. (2016). Effect of humic acid on growth and productivity of Egyptian lime trees. (*Citrus aurantifolia* Swingle) under salt stress conditions. *J. Agric. Res. Kafr El-Sheikh Univ. A. Plant production*. vol. 42, nº 4, pp. 494-505.
63. Kostov, O. (2018). Application of humic acid in a Malaysian supper large scale field experiment. 19TH International conference of humic substances and their contribution to the climate change mitigation. Balchik, Bulgaria.
64. Muhammad, W., Bashir A., Muhammad, A., Fazal, M., Abdul, L. K., Muhammad A., Sang-Mo, K., YoonHa, K. and In Jung L, (2014). Evaluation of humic acid application methods for yield and yield components of mungbean. *American J. Plant Sci.*, 5: pp. 2269-2276
65. Fageria, N. K. y Knupp, A. M. (2013). Upland rice phenology and nutrient uptake in tropical climate. *Journal of Plant Nutrition*, vol. 36, nº 1, pp. 1-14.
66. Schoebitz, M. (2016). Combined application of microbial consortium and Humic substances to improve the growth performance of blueberry seedlings. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, vol. 16, nº 4, pp. 1010-1023.
67. Amaya, L. A. (2017). Comportamiento de Algunos Compuestos Orgánicos e Inorgánicos en la Calidad de la Fresa, Saltillo, Coahuila: Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
68. Trevisan, S., Francioso, O., Quaggiotti, S. y Nardi S. (2010). Humic substances biological activity at the plant-soil interface: from environmental aspects to molecular factors. *Plant Signal. Behav.* 5. Pp. 635-43.
69. Calvo, P., Nelson, L y Kloepper, J.W. (2014). Agricultural uses of plant biostimulants. *Plant Soil*. pp.383: 3-41.
70. Piccolo, A., Celano, G. y Pietramellara, G. (1993). Effects of fractions of coal-derived humic substances on seed germination and growth of seedlings (*Lactuca sativa* and *Lycopersicum esculentum*). *Biol. Fertil. Soils* 16: pp. 5-11.
71. Andreux, F. (1996). Chapter 2, Humus in World Soils. *Humic Substances in Terrestrial Ecosystems*. Ed, Elsevier Science. Pages 45-100. <https://doi.org/10.1016/B978-044481516-3/50003-7>.

72. Stevenson, F.J. (1991) Organic matter-micronutrient reactions in soil. Micronutrients in agriculture. *Soil Science Society of America*, Madison, WI, USA, pp. 145-186.
73. Pinton, R., Cesco, S., Santi, S., Agnolon, F. y Varanini Z. (1999). Water-extractable humic substances enhance iron deficiency responses by Fe-deficient cucumber plants. *Plant Soil* 210: pp. 145-157.
74. Chen, Y., Clapp, CE. y Magen, H. (2004). Mechanisms of plant growth stimulation by humic substances: the role of organo-iron complexes. *Soil Science and Plant Nutrition*. 50. pp. 1089-1095.
75. Zanin, L., Tomasi, N., Cesco, S., Varanini, Z. y Pinton, R. (2019). Humic Substances Contribute to Plant Iron Nutrition Acting as Chelators and Biostimulants. *Frontiers in Plant Science*. 10. 10.3389/fpls.
76. Schnitzer, M. y Ghosh K. (1982). Characteristics of water-soluble fulvic acid –copper and fulvic acid – iron complexes. *Soil Science*. 134.pp. 354-363.
77. Esteves da Silva, J.C.G., Machado A.A.S.C y Oliveira C.J.S. (2009) Effect of pH on complexation of Fe(III) with fulvic acids. *Environmental Toxicology Chemistry*. <https://doi.org/10.1002/etc.5620170711>.
78. Wang S. y Mulligan C. N. (2009). Enhanced mobilization of arsenic and heavy metals from mine tailings by humic acid. *Chemosphere*. Volume 74, Issue 2, pp. 274-279.
79. Joshi, R., Singh J., y Pal Vig, A. (2014). Vermicompost as an effective organic fertilizer and biocontrol agent: effect on growth, yield and quality of plants. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, vol. 13, nº 3.
80. Clapp, C.E., Chen, Y., Hayes, M.H.B. y Cheng, H.H. (2001). Plant growth promoting activity of humic substances. *International Humic Science Society*, Madison, USA, pp. 243-255.
81. Nardi, S., Pizzeghello, D., Muscolo, A. y Vianello, A. (2002). Physiological effects of humic substances on higher plants. *Soil Biol. Biochem*. 34: pp. 1527-1536.
82. Pinton, R., Varanini, Z. y Nannipieri, P. (2007). The rhizosphere: biochemistry and organic substances at the soil-plant interface, 2ª edición. *CRC Press*, Madison, USA, p 447.
83. Brown, P. y Saa, S. (2015). Biostimulants in agriculture. *Frontiers in Plant Science*. Vol. 6, p 671.
84. Arevalo, G. y Castellano, M. (2009). Manual de fertilizantes y enmiendas, El Zamorano: Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central.

85. Senn, T. L. y Kingman, A. R. (1973). A review of Humus and Humic Acids. Horticulture Department Research Series No. 145, S. C. *Agricultural Experiment Station*, Clemson, South Carolina.
86. Deretil Agronutricional. (2015). Ferroactive. Quelatos de hierro. Available: <http://deretilagronutricional.com/catalogos/ferroactiv.pdf>.
87. Orera, I. (2010). Desarrollo y aplicación de nuevas metodologías analíticas al estudio de fertilizantes férricos. CSIC Estación Experimental de Aula Dei (EEAD). Zaragoza.
88. Fertilab. (2014). El Uso de Quelatos en la Agricultura: Quelatos para Aspersiones Foliaras.
89. Perea, E. (2010) Utilización de quelatos en la agricultura. *Synthesis*, nº enero- marzo.
90. Alloway, B.J. (2008). Micronutrient deficiencies in global crop production. *Springer*. 78-1-4020-6860-7.
91. Porter, G.S., Bajita-Locke, J.B., Hue, N.V. y Strand, D. (2004). Manganese solubility and phytotoxicity affected by soil moisture, oxygen levels, and green manure additions. *Comm. Soil Sci. Plant Anal.* 35, pp. 99-116.
92. Khabaz-Saberi, H. y Rengel, Z. (2010). Aluminum, manganese, and iron tolerance improves performance of wheat genotypes in waterlogged acidic soils. *J. Plant Nutr. Soil Sci.* 173, pp. 461-468.
93. Fullerton, T. (2005) Chelated Micronutrients. Agro Services International Inc.
94. Lill, R. y Muhlenhoff, U. (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes: components and mechanisms. *Annu Rev Biochem.* 77:669-700. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.052705.162653.
95. Lucena, J. J. (2009). El empleo de complejantes y quelatos en la fertilización de micronutrientes. *Revista Ceres*. Vol. 56, Julio - Agosto.
96. Aguado-Santacruz G. A., Gómez, B. M., Betzaida Jiménez F., Moya E. G. y Preciado Ricardo E. (2012) Impact of the microbial siderophores and phyto siderophores on the iron assimilation by plants: a synthesis. *Revista Fitotecnica Mexicana*, vol. 35, nº 1.
97. Rodríguez Lucena, P. (2010). Quelatos biodegradables y complejos como correctores de la clorosis férrica: Evaluación de complejos Fe-Lignosulfonato. Tesis Doctoral. Madrid.

98. Olivier, M. (2009). Efectos fisiológicos de las sustancias húmicas sobre los mecanismos de toma de hierro en plántulas de tomate. Tesis Doctoral. Alicante.
99. Alcañiz Luca, S. (2015) «Development of new formulations of EDDHA/Fe³⁺ chelates and methodologies for their analysis based on NMR. Tesis Doctoral. Alicante.
100. Silva, A. D. A. (2014). Teores de micronutrientes no solo e foliar com aplicação de fontes quelatadas e sulfatadas em feijão. *Engenharia Agrícola Eng. Agríc.* Vol.34 No.1, pp. 28-37.
101. Nuzzo, A & Sánchez-Sánchez, Antonio & Fontaine, Barbara & Piccolo, Alessandro. (2013). Conformational changes of dissolved humic and fulvic superstructures with progressive iron complexation. *Journal of Geochemical Exploration.* 129. pp. 1-5.
102. García-Marco, S., Martínez, N., Yunta, F., Hernández-Apaolaza, L y Lucena, J. J. (2006). Effectiveness of Ethylenediamine-N(o-hydroxyphenylacetic)-N'(p-hydroxyphenylacetic) acid (o,p-EDDHA) to Supply Iron to Plants. *Plant and Soil.* 279. 10.1007/s11104-005-8218-5.
103. EPA. Environmental Protection Agency. (2006). Guidelines for Environmental management of on-site remediation.
104. Perminova, I. V. y Hatfield, K. (2005). Remediation chemistry of humic substances: Theory and implications for the technology. *Use of Humic Substances to Remediate Polluted Environments: From Theory to Practice, Springer*, pp. 3-36.
105. Enkerlin, H., Ernesto, C., Cano, G., Garza Cuevas, R.A. y Vogel Martínez, E. (1997). Ciencia ambiental y desarrollo sostenible, México: International Thomson editores, ISBN: 9789687529028.
106. Burlakovs, J., (2013). The Impact of Humic Substances as Remediation Agents to the Speciation Forms of Metals in Soil. *Asia-Pacific Chemical, Biological & Environmental Engineering Society procedia*, Volumen 5, pp. 192-196.
107. Klulakova, M. y Pavlikova, M. (2017). Lignitic Humic Acids as Environmentally-Friendly Adsorbent for Heavy Metals. *Journal of Chemistry.* 1-5. 10.1155/2017/7169019.
108. Rajkumar, G. y Banerjee, D. K. (1996). Complexation of trace metals with humic acids from soil, sediment and sewage. *Chemical Speciation and Bioavailability*, vol. 9, nº 1, pp. 15-19.

109. Arslan, G., Cetin, S. y Pehlivan, E. (2007). Removal of Cu(II) and Ni(II) from aqueous solution by lignite-based humic acids. *Energy Sources, Part A: Recovery, Utilization, and Environmental Effects*, vol. 29, nº 7, pp. 619-630.
110. Kochany, J. y Smith, W. (2001). Application of humic substances in environmental remediation. WM'01 Conference, February 25-March 1 Tucson, AZ.
111. Cacho de Mesa, J. Dirección General de Calidad y Evaluación Ambiental y Medio Natural. (2016). Perfil Ambiental de España 2016. Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Secretaría General Técnica.
112. Ramos R., (2000). Aplicación de sustancias húmicas comerciales como productos de acción bioestimulantes. Efectos frente al estrés salino. Tesis Doctoral. Alicante.
113. Gobierno de España. (2008). El control de la salinidad y la lucha contra los efectos de la desertificación en la cuenca mediterránea. Ministerio de medio ambiente.
114. FAO. (1999) Food and Agriculture Organization of the United Nations, «Integrated soil management for sustainable agriculture and food security in southern and east Africa. Roma.
115. Ćwieląg P, I., Medyńska J, A., Jerzykiewicz, M., Debicka, M., Bekier, J., Jamroz, E. y Kawałko, D. (2018). Humic acid and biochar as specific sorbents of pesticides. *Journal of Soils and Sediments*. 18. 10.1007/s11368-018-1976-5.
116. Alexander, M. 1994. Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, San Diego.
117. Pantoja G, M., Ramirez , R y Valero, N. (2019). Improvement of mining soil properties through the use of a new bio-conditioner prototype: a greenhouse trial. *Journal of Soils and Sediments*. 19. 10.1007/s11368-018-2206-x.
118. Vargas, C. (2016). Utilización de sustancias húmicas comerciales para optimizar la fitoremediación de suelos mineros usando vetiveria (*Chrysopogon zizanioides* L. Robery) y verdolaga (*Atriplex portulacoides*). Tesis Doctoral. Madrid.
119. Senesi, N. y Loffredo, E. (2008). The Fate of Anthropogenic Organic Pollutants in Soil: Adsorption/Desorption of Pesticides Possessing Endocrine Disruptor Activity by Natural Organic Matter (Humic Substances). *J. Soil Sci. Plant Nutr.*, vol. 8, nº 3, pp. 92-94.

120. Fava, F., Berselli, S., Conte, P., Piccolo, A. y Marchetti, L. (2004). Effects of humic substances and soya lecithin on the aerobic bioremediation of a soil historically. *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 88, nº 2.
121. Wang, Y., Wang, J.-X. y Li, C.E. (2011). Remediation of Contaminated Soil and Groundwater Using Humic Acid in Permeable Reactive Barrier for. *International Conference on Pipelines and Trenchless Technology*.
122. Abdul, S.A., Thomas, L.G. y Devi, N.R. (1990). Use of humic acid solution to remove organic contaminants from hydrogeologic systems. *Environmental Science & Technology* 24 (3), pp. 328-333. DOI: 10.1021/es00073a006.
123. Interiano M. L. (2019). Métodos de biorremediación asistidos con ácido húmico para el tratamiento de recortes de perforación contaminados con aceite. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*, vol. 18, nº 3, pp. 929-938.
124. Lipczynska K, E., (2018). Humic substances, their microbial interactions and effects on biological transformations of organic pollutants in water and soil: A review. *Chemosphere*, vol. 202, pp. 420-437.
125. Gallardo, J, F. (2001). Mineralización y humificación de la materia orgánica del suelo. *Consecuencias sobre la contaminación*. Sociedad Colombiana de Ciencias del Suelo.
126. Dorronsoro C. (2005). Edafología, Lección 2. Constituyentes del suelo. Fase sólida. Available: <http://www.edafologia.net/introeda/tema02/transf.html>. (Consultado 04/05/2019)
127. Vincent, A., Turner, B. y Tanner, E. (2010). Soil organic phosphorus dynamics following perturbation of litter cycling in a tropical moist forest. *European Journal of Soil Science*. 61, pp. 48-57.
128. FAO. (2005). Food and Agriculture Organization of the United Nations The importance of soil organic matter. Roma.
129. Ribó, M., (2003). Balance de macronutrientes y materia orgánica en el suelo de agro sistemas hortícolas con manejo integrado ecológico. Valencia, España.
130. Food and agriculture organization of the United Nations. (2017). Soil Organic Carbon: the hidden potential. Roma.
-

131. Bolin, Bert. (1976). El ciclo del Carbono. *Química y la ecosfera*, Madrid, Hermann Blum.
132. Follett, R. F. (1995). Fate and Transport of Nutrients: Nitrogen. *United States. Soil Conservation Service*. Número 7 de Working paper. Fort Collins, Colorado.
133. Bidwell, R. (1993). Fisiología Vegetal. *Ed. A. Editores*. México DF: ADT Editor.
134. Sharpley, A. (1995). Fate and Transport of Nutrients: Phosphorus. USDA, *Agricultural Research Service*. Working Paper No. 8. National Agricultural Water Quality Laboratory. Durant, Oklahoma.
135. Edwards, P. J. (1998). Sulfur cycling, retention, and mobility in soils: A review Gen. *General Technical Report (GTR) Tech. Rep. NE-250*. Radnor, PA: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, Northeastern Research Station. p 18.
136. Maaz T, M. (2019) International Plant Nutrition Institute. Available: [http://www.ipni.net/publication/ialahp.nsf/0/A77BF5F95561AB058525801300603DC6/\\$FILE/Art%202.pdf](http://www.ipni.net/publication/ialahp.nsf/0/A77BF5F95561AB058525801300603DC6/$FILE/Art%202.pdf). (Consultado 19/12/2019)
137. Sanzano, A. (2019). El potasio del suelo. *Cátedra de Edafología*. FAZ. UNT.
138. Adani, F. (2008). Humic Acid Formation in Artificial Soils Amended with Compost at Different Stages of Organic Matter Evolution. *Journal of Environmental Quality* vol. 37, nº 4, pp. 1608-1616.
139. McBride, M. (1994). Environmental chemistry of soils. *Oxford*, Oxford University Press. ISBN-10: 0195070119.
140. Adani, F., Genevini, P.L., Gasperi, F. y Tambone, F. (2013). Composting And Humification. *Compost Science & Utilization*, 7:1, 24-33, DOI: 10.1080/1065657X.1999.10701949 .
141. Stevenson, F. J. (1994). Humus Chemistry: Genesis, Composition, Reactions 2nd Edition. John Wiley & Sons. ISBN: 978-0-471-59474-1.
142. Bleam, W. F. (2016). Soil and Environmental Chemistry. *Academic Press*. ISBN: 9780128041789.
143. Asing, J., Wong N. C. y Lau S. (2009). Optimization of extraction method and characterization of humic acid derived from coals and composts. *J. Trop. Agric. and Fd. Sc*, vol. 37, nº 2, pp. 211-223.

144. Swift, R.S. (1996). Organic matter characterization .pp. 1018-1020. Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Soil Science Society of Americ. Book Series: 5. Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI.
145. Weber, J. (2019). Definition of soil organic matter. Humitech. Available: https://www.humintech.com/fileadmin/Humintech/assets/literature_Hints_pdf/DEFINITION_OF_SOIL_ORGANIC_MATTER.pdf. (Consultado 19/12/2019)
146. Weber, J. (2009). Extraction of Soil Organic Matter. <http://karnet.up.wroc.pl/~weber/ekstrak2.html>. (Consultado 20/12/2019)
147. Carter, M.R. y Gregorich, E.G. (2007). Soil sampling and methods of analysis. 2nd Edition. CRC Press ISBN 9780849335860.
148. Kurniati, E., Muljani, Srie., Virgani, D. y Neno, B. (2018). Humic Acid Isolations from Lignite by Ion Exchange Method. *Journal of Physics: Conference Series*. 953. 012234. 10.1088/1742-6596/953/1/012234.
149. Rocha, J., Rosa A. y Furlan M. (1998). An Alternative Methodology for the Extraction of Humic Substances from Organic Soils. *Journal of The Brazilian Chemical Society - JBCS*. 9. 10.1590/S0103-50531998000100010.
150. Baglieri, A. y Ioppolo, A. (2007). A method for isolating soil organic matter after the extraction of humic and fulvic acids. *Organic Geochemistry* 38. 140–150, vol. 38, pp. 140-150.
151. Hayes B. M. (2006). Solvent Systems for the Isolation of Organic Components from Soils. *Soil Science Society of America Journal - SSSAJ*. 70. 10.2136/sssaj2005.0107.
152. Kouichi, M., Kazuhiro, M., Taisuke, M. y Jun, A. (1995). Solubilization of a brown coal in a solvent mixture of methanol and a non polar solvent at room temperature. *CSJ Journals*, pp. 909-910, Vol.24, No.10. <https://doi.org/10.1246/cl.1995.909>.
153. Okuda, A. y Hori, S. (1956) Some aspects on the nature of humic acid. *Soil Science and Plant Nutrition*, 2:1, 42-43, DOI: 10.1080/00380768.1956.10431854.
154. Serra, M. y Schnitzer, M. (1972). Extraction of humic acid by alkali and chelating resin. *Canadian Journal of Soil Science*, vol. 52, pp. 365-374.

155. Apea, O., Ephraim, J. y Isaac, O. (2013). Chemical extraction of humic substances using natural resins. nº 1, pp. 54-63.
156. Brezonik, P. L. (2015). Chemical differences of aquatic humic substances extracted by XAD-8 and DEAE-cellulose. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, vol. 3, nº 4b, pp. 2982-2990.
157. Drosos, M. (2017). A molecular zoom into soil Humeome by a direct sequential chemical fractionation of soil. *Science of The Total Environment*, vol. 586, pp. 807-816.
158. Piccolo, A. (2011). Basis of a Humeomics Science: Chemical Fractionation. *Biomacromolecules* 2011, vol. 12, nº 4, pp. 1187-1199.
159. Dhawan, H., Upadhyayula, S. y Sharma, D. (2018). Design of experiments to optimize the extraction parameters of a power grade Indian coal. *International Journal of Coal Science & Technology*. nº 5. pp. 1-13. DOI:10.1007/s40789-018-0216-3.
160. Jiang, P., Ma, Z. y Han, Y. (2010). Experimental Study on Extracting Humic Acid from Lignite. *Advanced Materials Research*. 158. 56-63. 10.4028/www.scientific.net/AMR.158.56.
161. Schnitzer, M., Schuppli, P. (1989). The extraction of organic matter form selected soils and particle size fractions with 0.5 M NaOH and 0.1 M Na₄P₂O₇ solutions. *Canadian journal of soil science*. v.69 nº.2. pp. 253-262.
162. Tomioka, S. (1965). Process of producing a soil nutrient by reacting a humic matter with nitric acid. USA Patente 3193300, 27 7.
163. Schwartz, N. (1968). Production of humic Acid». USA Patente 3398186, 20 8.
164. Stephen, M. C. (1969). Continuous nitric acid oxidation of coal. USA Patente 3468946, 3 9.
165. Calemma, V. y Rausa, R. (1987). Process for the production of regenerated humic acids from coal. EUR Patente EP0272737A2. 07 12.
166. William, J., Stuart, E., Lebo, Jr y Bushar, L.L. (1997) Production of acid soluble humates. EUR Patente EP0786490A2. 10 01.
167. Calemma V. y Rausa, R. (1993). Process for producing regenerated humic acids from coal». USA Patente 5248814, 28 9.

168. Sevastyanov, V. (2017). Method for comprehensively processing Brown Coal and Leonardite into humic fertilizers and preparations into fuel briquettes and mechanochemical reactor for processing Highly Viscous Media. USA Patente US20170036967A1, 9 2.
169. Shulgin A. I. (2017). Process for preparation of a granular humic mineral reagent. Patente US 9656109, Mayo 23.
170. Kononova, M. M.; Nowakowsky, Z. T. and Newman, D. C.A. 1966. Soil organic matter. Its nature, its role in soil formation and in soil fertility. 2nd. edit. Pergamon. Press. New York, USA.
171. Reglamento (CE) nº 2003/2003 del Parlamento Europeo y del Consejo, de 13 de octubre de 2003, relativo a los abonos.
172. <http://www.sc.ehu.es/sbweb/fisica/cuantica/fotoelectronico/fotoelectronico.htm>.
(Consultado 21/05/2020)
173. User guide to Modde.Versión 12., (2017). *Sartorius Stedim Data Analytics*.
174. Plackett, R.L. and Burman, J.P. (1946). The Design of Optimum Multifactorial Experiments. *Biometrika*, 33, 305-325. <http://dx.doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>.
175. Shmidt, S., Launsby, R., (2000). Understanding Industrial Designed Experiments. ISBN 10: 1880156032.
176. Fowlkes, W.Y., Creveling, C.M., (1995). Engineering Methods for Robust Productivity Design. ISBN-10: 9780133007039. Addison-Wesley.
177. Novales A., (2010). Análisis de Regresión Departamento de Economía Cuantitativa. Universidad Complutense.
178. Shmidt, S., Launsby, R. (2000). Understanding Industrial Designed Experiments, 4th Ed. *Air Academy Press & Associates*.
179. Dellino, G., Kleijnen, J. y Meloni, C. (2010). Robust optimization in simulation: Taguchi and Response Surface Methodology. *International Journal of Production Economics*.
180. Myers, R., Montgomery, D. y Anderson-Cook, C. (2009) Response Surface Methodology – Process and Product Optimization Using Designed Experiments, 3th Ed, *Wiley*.

181. Norman R., Smith H. (1998). *Draper Applied Regression Analysis*. Hoboken, NJ: Wiley-Interscience.
 182. Montgomery D.C., (2005). *Design and analysis of Experiments*, , 6th ed. Wiley . ISBN 9781119113478.
 183. Sartorius Stedim Data Analytics. (2017). *Modde user guide*.
 184. https://www.researchgate.net/post/How_to_prepare_Hoagland_solution_as_a_source_of_fertilizer_for_the_soil_medium. (Consultado 23/04/2020)
 185. Dereppe, J. M., Moreaux, C., Landais, P. y Monthieux, M. (1987). Study of artificial oxidation of a humic coal by ¹³C CP/Mas nuclear magnetic resonance. *Fuel* 66, pp. 594-599.
 186. Calemma, V., Rausa, R., Margarit, R. y Girardi, E. (1988). FT-IR study of coal oxidation at low temperatura. *Fuel* 67 (6), pp. 764-770.
 187. Calemma, V., Iwanski, P., Rausa, R. y Girardi, E. (1994). Changes in coal structure accompanying the formation of regenerated humic acids during air oxidation. *Fuel* 73 (5), pp. 700-707.
 188. <https://www.slideshare.net/jorgezaldivar1/clase-12-rocas-almacenadoras1>. (Consultado 19/12/2019)
 189. www.Hielscher.com
 190. Marsh, H., Heintz E. A. y Rodríguez-Reinoso F. (1997). *Introduction to carbon technologies*. Publicaciones de la Universidad de Alicante.
 191. Morrison, R. T. y R. N Boyd, (1976). *Química Orgánica 3ª Ed., Fondo de Cultura Interamericano, México*.
 192. El fascinante átomo de carbono. <https://www.carbotecnia.info/el-fascinante-atomo-de-carbono/>. (Consultado 05/05/2020)
 193. Aparicio A. (2010). Procesos de oxidación radicalaria y soluciones avanzadas para el tratamiento de efluentes industriales”, 1130-9881, en *Retema (Revista técnica de medio ambiente)*. Nº 23(140), pp. 28-35.
 194. Michel, T. (2004). *Procesos de oxidación radicalaria y soluciones avanzadas para el tratamiento de efluentes industriales DEISA*. Asagua.
 195. A. Huang, L. Cao, J. Chen, F.J. Spiess, S.L. Suib, T.N. Obee, S.O. Hay y J.D. Freihaut, (1999). Photocatalytic degradation of triethylamine on titanium oxide thin films. *Journal of catalysis*, 188(1), pp. 40-47.
-

196. Suzuki, K (1993). Photocatalytic air purification on TiO₂ coated honeycomb support. In Photocatalytic. Purification and treatment of water and air 3., pp. 421-434.
197. <http://www.varpa.org/recursos-educativos/efecto-fotoelectrico/index.html>. (Consultado 25/07/2020)
198. <https://www.areatecnologia.com/electricidad/efecto-fotoelectrico.html>. (Consultado 25/07/2020)
199. <http://www.varpa.org/recursos-educativos/efecto-fotoelectrico/index.html>. (Consultado 25/07/2020)
200. Akhanazarova, S., y Kafarov, V. (1982). Experiment optimization in chemistry and chemical engineering. Moscow: Mir Publishers.
201. Ahrens L.H., (1966) Ionization potentials and metal-amino acid complex formation in the sedimentary cycle. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, Volume 30, Issue 11, pp. 1111-1119.
202. Disnar, J.R., Trichet, J. (1983). Pyrolyse de complexes organo-métalliques formés entre un matériau organique actuel d'origine algale et divers cations métalliques divalents (UO₂⁺², Cu²⁺, Pb²⁺, Ni²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ et Co²⁺). *Chemical Geology*.
203. Sohn L, M; Hughes, C. M; (1981). Metal ion complex formation constants of some sedimentary humic acids with Zn(II), Cu(II) and Cd(II). *Geochimica et Cosmochimica Acta*. Volume 45, Issue 12. pp. 2393-2399.
204. Hirata S. (1981). Stability constants for the complexes of transition-metal ions with fulvic and humic acids in sediments measured by gel filtration. *Talanta*. Volume 28, Issue 11. pp. 809-815.

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Valores de cantidad de nutriente captado por la planta utilizando las diferentes dinámicas. Cultivo de maíz con un rendimiento de 9,5 tn ha ⁻¹ . Valores en kg ha ⁻¹ para cada nutriente (32).	12
Tabla 2.	Resumen de métodos de extracción.....	37
Tabla 3.	Rendimientos de extracción de carbón pardo con diferentes tratamientos.	39
Tabla 4.	Resultados de la patente US 3468946.....	55
Tabla 5.	Resultados obtenidos en la patente US 5248814	60
Tabla 6.	Tabla comparativa de las patentes analizadas.....	65
Tabla 7.	Matriz de diseño Plackett-Burman para N=16.....	86
Tabla 8.	Factores estudiados en el diseño de experimentos.....	87
Tabla 9.	Respuestas descritas para el estudio de activación.	89
Tabla 10.	Matriz ortogonal de valores +1 y -1, del presente trabajo	90
Tabla 11.	Tabla de experimentos realizados en este trabajo.	90
Tabla 12.	Variables relevantes en el análisis de varianza de una vía (ANOVA)	95
Tabla 13.	Tabla ANOVA para el contraste de hipótesis de la regresión	97
Tabla 14.	Solución nutritiva de Hoagland empleada en el cultivo hidropónico.	102
Tabla 15.	Parámetros analizados y metodología para el análisis del suelo donde se ha realizado el test	105
Tabla 16.	Resultados obtenidos en el proceso de molturación en fase líquida.	118
Tabla 17.	Tamaño medio de partícula obtenido aplicando diferentes porcentajes de la potencia nominal (0,4 kW).....	119
Tabla 18.	Datos obtenidos del carbón sin ser tratado con la molturación y tratado con la molturación	120
Tabla 19.	Condiciones de ensayos en la oxidación química.	123
Tabla 20.	Resultados obtenidos con diferentes oxidantes, HNO ₃ , KMnO ₄ y H ₂ O ₂	124
Tabla 21.	Pruebas con diferentes porcentajes de peróxido de hidrógeno.....	124
Tabla 22.	Porcentaje de extractos húmicos (EH) obtenidos con diferentes porcentajes de H ₂ O ₂	124
Tabla 23.	Referencia de colores con sus longitudes de onda.....	126
Tabla 24.	Resultados de rendimiento de extracción a diferentes longitudes de onda.	126
Tabla 25.	Descripción de pruebas comparativas con los diferentes procesos.	127
Tabla 26.	Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el hierro.	129
Tabla 27.	Tabla de resultados del test Anova para el hierro	130
Tabla 28.	Predicción de valores óptimos para la complejación del hierro	137
Tabla 29.	Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el manganeso.....	138
Tabla 30.	Tabla de resultados del test Anova para el manganeso	139
Tabla 31.	Valores óptimos para la complejación del manganeso	144
Tabla 32.	Resultados obtenidos en el diseño de experimentos para el cinc.	145
Tabla 33.	Tara de resultados del Test Anova para el cinc.....	146
Tabla 34.	Análisis fisicoquímico de suelo procedente de Utrillas.....	152
Tabla 35.	Características físico-químicas del suelo.....	157
Tabla 36.	Análisis de la rentabilidad de la aplicación para el precio medio de venta de la berenjena a 0,36 €/kg desde enero de 2017.	162

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo de materia orgánica en el suelo	17
Figura 2.	Izquierda: Estructura de un complejo coordinado con un Fe ²⁺ . Derecha Fe ³⁺ EDDHA	20
Figura 3.	Formación de las sustancias húmicas (88)	29
Figura 4.	Propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas (141)	33
Figura 5.	Fraccionamiento de sustancias húmicas bajo el esquema alcalino de Oden.	35
Figura 6.	Fraccionamiento del humus del suelo según el método de Stevenson (104)	36
Figura 7.	Método mixto para aislar materia orgánica después de la extracción de ácidos húmicos y fúlvicos (150)	42
Figura 8.	Esquema de fraccionamiento propuesto por <i>humeómica</i> (158). DCM (diclorometano); MeOH (Metanol); BF ₃ (trifluoruro de boro); HI (ácido yodídrico)	43
Figura 9.	Esquema de la patente US 3193300	49
Figura 10.	Diagrama de flujo de la patente US 3398186	51
Figura 11.	Esquema de la patente US 3468946	54
Figura 12.	Diagrama de bloques Patente EP 0786490 A2	57
Figura 13.	Diagrama de flujo del proceso. Patente US 5248814, 1993A partir de: Calemma	59
Figura 14.	Diagrama de flujo de la patente 2017/0036967 A1	62
Figura 15.	Diagrama de flujo de la patente US 9656109	63
Figura 16.	Diagrama de bloques para la extracción de sustancias húmicas	69
Figura 17.	Diagrama de bloques de la activación de las sustancias húmicas	71
Figura 18.	Reactor de cristal, con agitador de teflón	72
Figura 19.	Sonicador/Ultrasonidos	72
Figura 20.	Molino fase líquida y bolas de relleno que hay en su interior	73
Figura 21.	Grindómetro	73
Figura 22.	Tamices utilizados en el desarrollo experimental	74
Figura 23.	Medidor de clorofila	74
Figura 24.	Espectrofotómetro	75
Figura 25.	Espectrómetro de emisión atómica en plasma de acoplamiento inductivo (ICP-OES)	75
Figura 26.	Lámparas led	76
Figura 27.	Láminas con diferentes filtros de longitudes de onda	76
Figura 28.	Diagrama de bloques de la activación de sustancias húmicas con los factores asociados	87
Figura 29.	Disposición de los experimentos del ensayo hidropónico	103
Figura 30.	Diagrama de bloques del proceso desarrollado	112
Figura 31.	Disposición del filtro de color para la prueba a diferentes rangos de longitudes de onda	114
Figura 32.	Tratamiento para la reducción de tamaño	115
Figura 33.	Imagen (a) carbón sin tratar 50X. Imagen b) carbón tratado 200X tras el proceso de molturación en vía húmeda y sonicación	120
Figura 34.	a) Molécula de carbón sin activar. b) Molécula de carbón activada. (192)	121
Figura 35.	Proceso de oxidación de una molécula de carbono. Fuente: elaboración propia	122
Figura 36.	Efecto Fotoeléctrico (197)	122
Figura 37.	Energía de la luz visible en función de su longitud de onda (198)	123
Figura 38.	Lámparas led utilizadas para la prueba de extracción de sustancias húmicas a diferentes longitudes de onda	125
Figura 39.	Ejemplo de disposición de las láminas para la radiación a diferentes longitudes de onda a) 620 - 750 nm. b) 495 - 570 nm	125

Figura 40.	Resultados Test Anova para el hierro.	130
Figura 41.	Influencia de factores para el estudio del hierro	131
Figura 42.	Análisis de predicción de los factores Conclni y pH_1 frente al porcentaje de complejación del hierro.....	133
Figura 43.	Análisis de predicción de los factores Conclni y Tie1_Re frente al porcentaje de complejación del hierro.....	134
Figura 44.	Análisis de predicción de los factores Conclni y Tie2_Re frente al porcentaje de complejación del hierro.....	135
Figura 45.	Análisis de predicción de los factores Conclni y ConμFe frente al porcentaje de complejación del hierro.....	136
Figura 46.	Resultados Test Anova para el manganeso.	139
Figura 47.	Influencia de factores para el estudio del manganeso	140
Figura 48.	Análisis de predicción de los factores Conclni y pH_1 frente al porcentaje de complejación del manganeso.....	141
Figura 49.	Análisis de predicción de los factores Conclni y Tie1_Re frente al porcentaje de complejación del manganeso.....	142
Figura 50.	Análisis de predicción de los factores Conclni y ConμMn frente al porcentaje de complejación del manganeso.....	143
Figura 51.	Resultados Test Anova para el cinc.....	146
Figura 52.	Influencia de factores para el estudio del cinc.....	147
Figura 53.	Concentración de hierro en las hojas en función del tiempo para los diferentes tratamientos aplicados. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	153
Figura 54.	Concentración de hierro en el tallo. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	154
Figura 55.	Concentración de hierro en las raíces. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3).	155
Figura 56.	Absorción de hierro. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	158
Figura 57.	Absorción de micronutrientes a los 45 días de aplicación. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	159
Figura 58.	Absorción de micronutrientes a los 90 días de aplicación. Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	160
Figura 59.	Contenido en clorofila ($\mu\text{mol m}^{-2}$). Las barras de error corresponden al error estándar (N=3)	161
Figura 60.	Producciones medias por corte y semana a partir de enero de 2017.	162

ÍNDICE DE ECUACIONES

cuación 1	79
Ecuación 2	79
Ecuación 3	81
Ecuación 4	82
Ecuación 5	82
Ecuación 6	83
Ecuación 7	83
Ecuación 8	85
Ecuación 9	91
Ecuación 10	91
Ecuación 11	92
Ecuación 12	92
Ecuación 13	92
Ecuación 14	92
Ecuación 15	92
Ecuación 16	93
Ecuación 17	93
Ecuación 18	93
Ecuación 19	94
Ecuación 20	94
Ecuación 21	94
Ecuación 22	94
Ecuación 23	96
Ecuación 24	96
Ecuación 25	96
Ecuación 26	96
Ecuación 27	96
Ecuación 28	97
Ecuación 29	97
Ecuación 30	98
Ecuación 31	98
Ecuación 32	98
Ecuación 33	98
Ecuación 34	99
Ecuación 35	99
Ecuación 36	99
Ecuación 37	100
Ecuación 38	100
Ecuación 39	100
Ecuación 40	100
Ecuación 41	116