



## REVISIÓN ANALÍTICA DE SUSTANCIAS HÚMICAS EN SUELOS Y COMPOST

Gonzalo Almendros

*Departamento de Suelos. Centro de Ciencias Medioambientales [CSIC], Serrano 115 B,  
28006-Madrid [Spain]. E-mail: [humus@ccma.csic.es](mailto:humus@ccma.csic.es)*

*Las sustancias húmicas representan los constituyentes más activos de la materia orgánica del suelo en términos de sus funciones ambientales y agroecológicas. Estas sustancias son definidas convencionalmente en función de sus propiedades solubles [p.ej., ácido húmico = fracción insoluble en ácido, ácido fúlvico = fracción soluble en ácido], y ocurre en suelos y en sedimentos fosilizados y recientes. Sin embargo, no está clara su presencia en residuos orgánicos compostados y en la mayoría de fertilizantes orgánicos. Por esta razón, y principalmente para el caso de las enmiendas orgánicas obtenidas de la transformación controlada de biomasa agrícola o residuos urbanos (composts...), la evaluación de la calidad físicoquímica de las sustancias húmicas es más importante que la cuantificación de la cantidad de estos materiales. Esta evaluación requiere la aplicación e interpretación de índices específicos así como el uso de técnicas de caracterización molecular para determinar la amplitud a la cual estas sustancias húmicas presentan constituyentes estructurales específicos o propiedades agroquímicas similares a las que se dan en la materia orgánica formada en el suelo.*

### 1. Química del Humus. Materia orgánica del suelo

#### 1.1. Constituyentes de la materia orgánica del suelo: biomacromoléculas y sustancias húmicas

Hay una parte de la materia orgánica del suelo que muestra una composición química con características estructurales compartidas con los constituyentes macromoleculares de la biomasa de vegetales y de origen microbiano [p.ej., celulosas, hemicelulosas, ligninas, cutinas, suberinas y proteínas]. Estos constituyentes biogénicos tienden a ser degradados con mayor o menor facilidad en CO<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O (proceso de mineralización). Sin embargo, una cantidad significativa de materia orgánica del suelo puede comportarse como recalcitrante (a una escala temporal de siglos) como resultado de la modificación química y las interacciones con otros constituyentes del suelo (proceso de humificación). Tales materiales macromoleculares resistentes a la biodegradación son referidos genéricamente como sustancias húmicas, las cuales representan la mayor reserva de carbono orgánico en la superficie de la Tierra y se caracterizan por estar compuestas por una mezcla polidispersa de macromoléculas de estructura caótica. Las sustancias húmicas presentan una estructura extremadamente compleja: se comportan como un continuo donde posiblemente no hay dos macromoléculas exactamente iguales. Pueden ser clasificadas operacionalmente en términos de sus propiedades solubles [1]: los ácidos húmicos (HAS) son extraídos de los suelos con soluciones alcalinas y convertidos en precipitados insolubles tras la acidificación, los ácidos fúlvicos son solubles tanto en soluciones ácidas como alcalinas, y las huminas son la materia orgánica en los residuos alcalinos.

Desde el punto de vista ambiental, hay un doble interés en el estudio de las sustancias húmicas: son una fuente de conocimiento ambiental (la evaluación del impacto ambiental en suelos) pero también actúan como constituyentes activos del suelo. De hecho, las

sustancias húmicas son consideradas tradicionalmente como una fuente de nutrientes de liberación lenta para las plantas y una reserva de coloides orgánicos con un papel principal en la regulación de procesos de nutrición de vegetales, movilidad de iones tóxicos y en la agregación, estructura y capacidad de retención hídrica del suelo.

No hay conocimientos actuales de la estructura de los HAs, aunque se asume que consisten en un reticulado flexible formado por agregaciones hieráticas de micelos incluyendo campos bastante definidos parecidas a macromoléculas conocidas en seres vivos. Las sustancias húmicas tienen una estructura de microporos que permiten el fenómeno de difusión de compuestos de bajo peso molecular. Son anfifílicos, con superficies reactivas hidrofóbicas e hidrofílicas. Los métodos químicos húmedos basados en la titulación de grupos funcionales indican la dominancia de grupos carboxilos, fenólicos, hidroxílicos, alcohólicos y quinoides [2, 3].

Según lo esperado, la cuantificación de cualquier constituyente definido o grupo estructural en un continuo de unidades con unas series de características compartidas es una tarea complicada y ha conducido a una serie de clásicas controversias. Por ejemplo, estudios usando resonancias magnéticas nucleares con  $^{13}\text{C}$  sugieren una nueva estimación de aromaticidad en HAs y han conducido a una revisión crítica de los resultados obtenidos por métodos de degradación oxidativa drástica [4, 5]. De hecho, se admite normalmente que las estructuras alifáticas en HAs son mucho más abundantes de lo que anteriormente se creía, ya que los modelos de estructura clásica tuvieron un gran alcance basado en la química de la lignina y el carbón. En cualquier caso, está claro que no hay una técnica experimental individual que dé una imagen clara de la estructura de los HAs, y el uso de varios métodos complementarios proporciona una visión más fiable de sus características. En otras palabras, las limitaciones de una poderosa analítica y técnicas instrumentales que son confiables para la caracterización molecular de biomacromoléculas complejas podrían ser debidas al hecho que la mayor parte de la estructura de HA consiste en una "megamolécula" formada por una red de enlaces C-C y C-O, sin unidades estructurales discretas pero con una estabilidad similar a la degradación química y biológica de todos los enlaces envueltos en la estructura completa.

## 1.2. Limitaciones de la caracterización molecular de sustancias húmicas

Los ácidos húmicos tienen un origen complejo y una estructura macromolecular heterogénea dependiendo de los materiales originales (tipo de vegetación, biomasa microbiana...) y las condiciones ambientales en los diferentes tipos de suelo [3, 6, 7]. Incluyen fracciones aromáticas y alifáticas (*O*-alquilo y alquilo) y unas series de grupos funcionales con O (principalmente carboxilos y fenoles OH) en superficies con diferentes reactividad [8].

En lo concerniente al análisis estructural de las sustancias húmicas, algunas metodologías consisten en la degradación química o térmica seguida por la identificación de los fragmentos por técnicas como la cromatografía de gases/espectrometría de masas. Algunos fragmentos típicos liberados por sustancias húmicas por estos acercamientos son alcanos, ácidos grasos,  $\alpha,\omega$ -diácidos alcanóicos, OH-ácidos grasos, ácidos fenólicos, ácidos bencenocarboxílicos, compuestos furanos y algunas moléculas conteniendo N- y S-. En algunos casos, estas técnicas ofrecen un diagnóstico interesante de compuestos biomarcadores con un claro valor quimiotaxonómico. Sin embargo, las técnicas de degradación química a menudo conducen a una pérdida selectiva de "bloques de construcción" lábiles, específicos, así como producciones cuantitativas en polarización negativa de los diferentes constituyentes. Alternativamente, hay técnicas derivativas suaves que dejan grandes cantidades de residuo no-degradado, pero los compuestos anteriores de la firma o biomarcador pueden ser preservados, ofreciendo pistas válidas en

los precursores de HA [3, 9]. Estos métodos no-destructivos, principalmente por espectroscopio en los rangos visible, infrarrojo y nuclear, informa sobre las cantidades relativas de las unidades estructurales principales (álcalis, *O*-álcalis, aromáticas,...), y en algunos casos también es posible una cuantificación tosca de algunos grupos funcionales [10, 12].

### 1.3. Sustancias húmicas del suelo y secuestro de C en el suelo

El secuestro de carbono es el resultado de una serie de procesos a través de los cuales el CO<sub>2</sub> atmosférico es extraído de la circulación biogeoquímica y almacenada en el suelo y la biomasa. Los procesos que llevan a la estabilización del C atmosférico (p.ej., el proceso de humificación natural, la producción de enmiendas recalcitrantes o incluso procesos industriales para producir diferentes tipos de carbón vegetal) tienen un interés ambiental y socio-económico [13]. Diferentes procesos simultáneos e interrelacionados están envueltos en el secuestro de C: preservación selectiva de biomasa, alteración diagenética de biomacromoléculas y humificación por neoformación en *sensu stricto* (microbiana, enzimática o abiótica). En los casos más favorables, la evaluación de su amplitud variable (en escala espacial o temporal) puede ser realizada usando técnicas de aislamiento y análisis de compuestos biomarcadores libres – o marcados – que se dan en las fracciones lipídicas [14]. Esto es complementado por los análisis moleculares de sustancias húmicas macromoleculares por degradación química y/o térmica seguida de una espectrometría de masas, o el uso de métodos no destructivos como los espectroscopios de resonancia visible, infrarroja o nuclear [NMR]. En general, no hay una única aproximación experimental para identificar exactamente las sustancias formadas en cada uno de los procesos mencionados anteriormente, como las diferentes rutas de humificación que llevan con frecuencia a sustancias de estructuras y propiedades comunes [7].

Los factores del suelo relacionados con la retención de formas de C en suelos pueden ser divididos en factores intrínsecos y extrínsecos, según:

#### *1.3.1. Factores intrínsecos*

1.3.1.1. *La resistencia de unidades estructurales.* En general, depende de las cantidades relativas de unidades estructurales (aromáticas, álcalis, conteniendo N- y O-). Las unidades aromáticas han sido consideradas tradicionalmente como más resistentes a la degradación que las estructuras alifáticas (*O*-álcalis, álcalis).

1.3.1.2. *Factores de enlaces intramoleculares.* Están relacionados con el grado de condensación estructural, lo cual también depende del número de enlaces intramacromoleculares o de las cantidades de "bloques de construcción" polifuncionales.

1.3.1.3. *Estabilidad inducida por la estructura caótica.* Durante los procesos de humificación hay un incremento progresivo de la complejidad estructural de las macromoléculas húmicas, lo que las convierte en difícilmente reconocibles por las enzimas microbianas. Esta estructura caótica y la morfología fractal de los coloides húmicos ha sido relacionada recientemente con la estabilización del C del suelo [15, 16].

#### *1.3.2. Factores extrínsecos*

En adición a los factores climáticos y locales (inundaciones, temperatura, topografía, etc.) hay bastantes procesos dependientes del suelo, no directamente conectados con la composición química de la materia orgánica secuestrada.

1.3.2.1. *Protección física.* En general, está relacionada con los patrones de microcompartimentación de las fracciones particuladas [17, 18]. Los microagregados del suelo proporcionan una variedad de microambientes donde las reacciones químicas y biológicas ocurren a diferentes tasas [19, 20]. Esto puede llevar a *procesos de preservación selectiva* [21] por la obstaculización de la difusión de enzimas microbianas para encapsular el material en microagregados. También, la *influencia de minerales como carbonatos o alófanos* que estabilizan formas de materia orgánica tanto particuladas como solubles [1], así como el *papel adicional de los lípidos del suelo* en la contribución a la resistencia al agua de agregados del suelo, lo que proporciona una encapsulación eficiente de la materia orgánica [22]. En particular, la extensión a la cual las sustancias húmicas coloidales son insolubilizadas en la matriz mineral pueden ser evidenciadas en el laboratorio usando tratamientos desmineralizadores fuertes seguidos por la extracción de la materia orgánica insolubilizada. Tal protocolo evidencia la cantidad de C en complejos estabilizados con arcillas y sesquióxidos, los cuales son referidos como *huminas extractables* [23].

1.3.2.2. *Inhibidores del crecimiento microbiano del suelo.* Unas series de compuestos antimicrobianos (terpenos, antibióticos fúngicos) e inhibidores enzimáticos (p.ej. algunos fenoles) liberados por plantas o microorganismos pueden desempeñar un papel eficaz en el control de las tasas de reciclaje de C [24-26]. Frecuentemente, la biomasa (madera, hojas) de bastantes especies Mediterráneas también contienen aceites esenciales con una función alelopática original en el vegetal vivo, que permanece activa en el suelo y causa una preservación no selectiva de la mayoría de los constituyentes biomacromoleculares del vegetal.

## 2. Los procesos de formación de sustancias húmicas

Los procesos de humificación deberían ser considerados de importancia capital en la comprensión de la calidad del suelo y los mecanismos de secuestro de C, e incluye unas series de procesos interrelacionados no exclusivos y convergentes.

### 2.1. Mecanismos de estabilización a través de la alteración de material macromolecular preexistente que no requieren una degradación completa previa de la materia orgánica inicial

#### *2.1.1. Alteración estructural progresiva de biomacromoléculas y formación de fracciones orgánicas heredadas*

Estas alteraciones prevalecen en tipos de humus con una actividad biológica baja y media, y ocurren principalmente en vegetales originalmente recalcitrantes y biomacromoléculas microbianas [1, 27]. En el caso de ligninas, la reorganización estructural de macromoléculas inducidas por microorganismos [reutilización microbiana] es acompañada por demetoxilación, dealcalización, carboxilación y posterior incorporación de productos conteniendo N y estructuras álcalis derivadas la mayoría de biomasa microbiana [28]. Procesos similares ocurren durante la alteración microbiana de biopoliésteres [cutinas y suberinas] [29, 30] y los llamados cutenos, suberanos, botriococanos y biomacromoléculas recalcitrantes de plantas vasculares o microorganismos [p.ej. cianobacterias] poseyendo todavía una estructura desconocida [31].

### 2.1.2. Alteración de formas biosintéticas análogas de sustancias húmicas

La síntesis microbiana de sustancias de color oscuro resistentes a la biodegradación es también una fuente de materia orgánica [32]. La importancia cuantitativa de las llamadas melaninas fúngicas [33] ha sido evidenciada en la mayoría de los tipos de suelos [34, 35]. Algunas melaninas frecuentes derivan de la condensación de compuestos de binaphthyl y pueden ser reconocidas por separación cromatográfica o por espectroscopía derivada desde que la presencia de unidades de 4,9-dihidroxiperileno-3,10-quinona es delatada por picos bien definidos en aprox. 455, 530, 570, 620 nm [36]. Las anthraquinonas son otros pigmentos fúngicos que pueden ser identificados tras aislamientos químicos húmedos.

## 2.2. Sustancias húmicas procedentes de la condensación de precursores de bajo peso molecular generados a partir de la hendidura de biomacromoléculas o síntesis biológica

### 2.2.1. Reacciones bioorgánicas intra o extracelulares no relacionadas al metabolismo primario

Una larga variedad de compuestos reactivos de vegetales y microorganismos coexisten en la solución del suelo hasta que son extraídos a través de la biodegradación o condensación en estructuras macromoleculares [37]. Este es el caso de la *condensación enzimática* de compuestos generados durante la biodegradación de lignina y otras biomacromoléculas [38]. La *autólisis celular* (esto es, la combinación de el contenido de lisosomas y vacuolas) p.ej., en hojas senescentes [39], y la *condensación de lixiviados de la hoja* o *exudados de la raíz* que son favorecidos por la matriz de las enzimas del suelo.

### 2.2.2. Síntesis abiótica de precursores aromáticos o alifáticos simples

Una larga serie de experimentos de laboratorio han mostrado condensaciones en mezclas concentradas de compuestos reactivos como los fenoles o aminoácidos volviéndose en productos de condensación de alto peso molecular de color marrón [40], esto es las sustancias del *tipo catecol-glicina* [41].

### 2.2.3. Síntesis de análogos de productos de Maillard

La condensación de aminoácidos y carbohidratos, un proceso clásico que se da al cocinar alimentos, conduce a macromoléculas heterogéneas [42, 43]. Ha sido indicado que pueden ocurrir reacciones similares, a lo largo de los años, en suelos y sedimentos [44] donde la materia orgánica es preservada de la rápida biodegradación por bajas temperaturas, anegaciones, oligotrofia o presencia de productos antisépticos. Similares a los productos de Maillard son las sustancias macromoleculares formadas abióticamente a través de la deshidratación de carbohidratos en medios pobres en nitrógeno (pseudomelanoidinas). En situaciones extremas, como son los suelos afectados por un incendio, los procesos conducen a una serie de partículas orgánicas carbonizadas progresivas y finalmente al llamado "carbón negro" [45].

### 2.2.4. Condensación de ácidos grasos insaturados

La condensación abiótica de lípidos insaturados puede llevar a macromoléculas en materia orgánica disuelta como los HAs marinos, pero también en suelos terrestres. Los lípidos insaturados pueden condensarse rápidamente en redes poliálcalis formadas a través de enlaces de media cadena. En los estados de transformación avanzados, se pueden formar estructuras de ciclohexano e incluso los anillos aromáticos, y la estabilidad macromolecular de la sustancia resultante podría incrementarse también a través de enlaces cruzados internos adicionales. Tales reacciones de foto-oxidación han sido consideradas la senda principal de

humificación para la materia orgánica similar al humus de alta mar [46]. En suelos terrestres, la presencia de óxidos, arcillas y otros catalizadores inorgánicos puede incrementar el envejecimiento fotoquímico y la resinificación de lípidos y su asociación a sustancias húmicas preexistentes, especialmente en ecosistemas Mediterráneos secos y cálidos donde la actividad biológica está limitada por la falta de agua en la capa superior del suelo [27].

### **3. Evaluación metodológica de los diagnósticos de características estructurales en sustancias húmicas y de tipo húmico**

La composición específica de las sustancias de tipo húmico procedentes de biomasa residual compostada podría ser revelada por técnicas estructurales de aplicación general.

#### 3.1. Espectroscopia visible

El intenso color oscuro de los HAs es el resultado de la gran variedad de grupos cromóforos y auxocromos, junto con una alta concentración de radicales libres estables, probablemente grupos semiquinonas, hecho que ha sido apoyado por resonancia del espín de electrones [47]. La gran falta de rasgos distintivos en el espectro visible (rango de 800-200 nm) de las sustancias húmicas y de tipo húmico [espectro monótono, con ausencia de picos marcados o patrones fácilmente reconocibles] no son sino una consecuencia de su estructura macromolecular caótica y polidispersa. Se consideran tres rasgos principales cuando se examina el espectro visible:

##### *3.1.1. La extinción específica (la densidad óptica a concentración constante)*

Este índice [p.ej.  $E_{465}$  nm] se incrementa con la aromaticidad y la madurez, siendo comparativamente baja en la sustancias HA de composts [48].

##### *3.1.2. El $E_{465}/E_{665}$*

Este índice refleja la pendiente de la curva espectral completa, que se considera que se incrementa cuando disminuye el tamaño molecular. En algunos casos (por ejemplo, algunos composts urbanos), el tamaño molecular de las sustancias de tipo húmico tiende a decrecer cuando se incrementa la madurez (los precursores son de alto MW) pero nos es un comportamiento generalizado [49].

##### *3.1.3. Los patrones espectrales reconocidos tras un aumento de la resolución o la segunda derivada del espectro*

En general, las sustancias tipo HA de composts muestran tendencia a un espectro completamente monótono. Los ácidos húmicos del suelo frecuentemente muestran los débiles picos indicados anteriormente a 455, 530, 570 y 615 nm, correspondientes a los pigmentos perilenequinónicos de origen fúngico, informando de rutas complejas de humificación donde los hongos de color oscuro (a menudo Deuteromycotina) juegan un papel en la formación de materia húmica [50]. Estos picos espectroscópicos pueden ser medidos en la segunda derivada del espectro, y en algunos casos son útiles para cuantificar la extensión (en el espacio y en el tiempo) de la sustitución de la materia orgánica original del suelo en suelos vírgenes por fuentes externas de materia orgánica de materiales residuales. De hecho, la presencia de pigmentos perilenequinónicos es una característica evidente de suelo, que no se encuentra con frecuencia en composts.

### 3.2. Espectroscopia infrarroja

La espectroscopia infrarroja es usada en muestras de suelo completo o sustancias de tipo húmico de composts para identificar grupos funcionales y la naturaleza de los enlaces entre las unidades estructurales [51]. Esto es válido para medidas semicuantitativas (esto es, los datos manejados como tasas entre las bandas de absorción principales), pero la mejora de la cuantificación requiere una reflexión interna múltiple [52]. La intensidades no deben ser interpretadas directamente en términos estructurales debido a que la absorbancia molar tiene una gran variabilidad en los grupos envueltos: las estructuras proteicas y alquilos tienen una gran "visibilidad", mientras que las estructuras aromáticas muestran pobres intensidades de bandas.

El espectro infrarrojo de las sustancias húmicas puede ser altamente afectado por impurezas de minerales cristalinos (más de un 5% en cenizas acompañando al material puede llevar a severos solapamientos de bandas orgánicas y minerales).

Los modelos infrarrojos de banda ancha de sustancias húmicas, se oponen a los patrones infrarrojos en los compuestos más simples debido a los procesos de enlaces intramoleculares de H y a la estructura caótica y el alto grado de redundancia estructural en la estructura de HA. Los modernos espectrofotómetros de infrarrojos asistidos por ordenador ofrecen un incremento de la resolución del espectro especialmente útil para el reconocimiento de patrones en el espectro de mezclas macromoleculares complejas, principalmente en el rango de 2000-400  $\text{cm}^{-1}$ . Además, el espectro infrarrojo puede estar sujeto a substracciones para enfatizar las bandas espectrales incrementando o disminuyendo en intensidad en el curso de la madurez [4].

Unas series de unidades estructurales son reconocibles por espectroscopia infrarroja: 3400  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" O-H), 2900  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" C-H alifático), 1720  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" C=O), 1600-1650  $\text{cm}^{-1}$  (C=C olefínicos y aromáticos), 1660-1630  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" C=O en amidas), 1590-1517  $\text{cm}^{-1}$  (N-H en amidas), 1510  $\text{cm}^{-1}$  (C=C aromático), 1470-1380  $\text{cm}^{-1}$  (C-H alifático), 1460  $\text{cm}^{-1}$  (enlace C-H álcali), 1435-1420  $\text{cm}^{-1}$  (grupos siringil ArO-CH<sub>3</sub> y estructuras lignina guaiacil), 1330-1325  $\text{cm}^{-1}$  (siringil), 1270  $\text{cm}^{-1}$  (C-O-C de éteres, C-OCH<sub>3</sub> en guaiacil), 1230  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" O-H en grupos carboxilos) y 1120-1000  $\text{cm}^{-1}$  ("stretching" C-O en alcoholes p.ej., carbohidratos).

Respecto a la evaluación de la transformación diagenética de sustancias húmicas por espectroscopia de infrarrojos, aquellos derivados de la lignina muestran un patrón más o menos definido de bandas a 1510, 1460, 1430  $\text{cm}^{-1}$  [53]. El material derivado de biomasa microbiana, materia orgánica acuática o aquella formada bajo condiciones hidromórficas como los lodos de depuradora, a menudo muestran bandas amidas intensas (1550 y 1660  $\text{cm}^{-1}$ ), un intenso pico álcali a 2920  $\text{cm}^{-1}$  y una vibración del carbohidrato cerca de 1000  $\text{cm}^{-1}$ . En general, el grado de oxidación (grupos carboxilos y 1720  $\text{cm}^{-1}$ ) es sistemáticamente más alto en material terrestre que en el hidromórfico [54]. Sin embargo, la abundancia de lípidos en las sustancias tipo húmicas de biomasa microbiana o algal, o de los residuos urbanos, a menudo conduce a sustancias tipo HA donde el pico carboxilo es intenso, pero rota a *circa* 1740  $\text{cm}^{-1}$  (ésteres en grasas y ceras). Un doblete (1720, 1740  $\text{cm}^{-1}$ ) es frecuente cuando coexisten lípidos libres y esterificados. Estas muestras ricas en lípidos pueden también mostrar un pico diagnóstico a 740  $\text{cm}^{-1}$  debido al enlace "balanceado" de polimetileno [55].

### 3.3. Resonancia magnética nuclear

En general, el uso de NMR <sup>13</sup>C en el análisis de sustancias húmicas y tipo húmicas está limitado por la disponibilidad de instrumentación costosa y el largo tiempo de adquisición - algunos instrumentos requieren un tiempo de adquisición hasta el día siguiente cuando las bajas cantidades (< 100 mg) de la muestra están disponibles-. Esta técnica se volvió muy

popular debido a su carácter no destructivo, la fácil diferenciación entre carbonos álcals y *O*-álcalis, el pico de diagnóstico de grupos metoxilo (derivados de la lignina) y principalmente el hecho de que, bajo condiciones de adquisición específicos, las medidas del área del pico en el espectro se considera que aportan datos cuantitativos fiables de los cuatro tipos principales de carbono [56], esto es, 0-46 ppm = álcali +  $\alpha$ -amino (13= metil, 21= acetato, 33= polimetileno); 46-110 ppm= *O*-álcali (56= metoxilo,  $\alpha$ -amino; 103-105= C anomérico en carbohidrato, carbonos aromáticos cuaternarios en taninos); 110-160 ppm= aromáticos o insaturados (126= insustituídos, 147-153= heterosustituídos, unidades de lignina vanillil + siringil); 160-200 ppm= carbonil (172= carboxilo + amida, 198= cetona o aldehído). En particular el radio entre los compuestos derivados de carbohidratos derivados de la lignina es útil para distinguir materia orgánica originaria del suelo de la materia orgánica del compost y, en el último caso, también puede ser utilizada como un índice de madurez. Además de esto, y cuando los minerales paramagnéticos son escasos, el NMR  $^{13}\text{C}$  puede ser usado en el análisis de muestras que poseen grandes cantidades de minerales de acompañamiento, incluyendo suelos completos [57].

Las limitaciones del NMR  $^{13}\text{C}$  en el análisis de sustancias de tipo húmico consisten principalmente en la pobreza específica de algunas regiones espectrales: en particular, las estructuras proteicas producen señales solapadas con estructuras carbonilo, metoxilo y álcali. Otra región confusa es la región 46-110 ppm *O*-álcali, la cual está invocada a corresponder a estructuras de carbohidratos (pueden ser reconocidos picos típicos de unidades piranosido), pero esta región es sistemáticamente alta en sustancias húmicas, incluso en aquellas que no transforman azúcares tras la hidrólisis ácida. Esta inconsistencia es interpretada como la presencia de anhidroazúcares o material no carbohidratado hidrolizable *O*-álcali como pueden ser algunos taninos. El problema adicional es la pobre especificación de los picos carbonilos [ $\sim$ 172 ppm], la intensidad de la cual no siempre está bien correlacionada con la acidez total determinada por métodos químicos húmedos. Este podría ser un efecto de la posible ocurrencia de grupos funcionales no titrables en superficies intramoleculares de sustancias húmicas, y de el hecho de que los ésteres y proteínas contribuyen a la intensidad de este pico NMR con un máximo a ca. 172 ppm [12, 58].

La madurez del compost (carácter HA) es reconocida por una aromaticidad aumentada, la disminución selectiva de estructuras alifáticas (estructuras álcali + *O*-álcali) y el incremento de estructuras carboxilo. Los ácidos húmicos de ligninas muestran la región aromática dividida en dos señales con picos a 153 y 147 ppm (unidades siringil y guaiacil), considerando que las sustancias de la materia orgánica fósil (tipo querógeno) tienden a mostrar un espectro bimodal con una región aromática prominente (max. A 126 ppm) y un pico álcali significativo (33 ppm). Los residuos urbanos tienden a sustancias tipo húmicas con regiones espectrales importantes para estructuras de álcali y *O*-álcali, y pobres concentraciones de grupos C=O, en gran parte debido a ésteres alifáticos [59].

#### 3.4. Acercamientos degradativos para la caracterización estructural de sustancias húmicas

La degradación analítica exitosa de HA macromolecular de sustancias HA requiere: i) la selección del reactivo adecuado, ii) la recuperación de productos de la degradación, iii) la separación por cromatografía (gas, líquida), y iv) la identificación estructural de compuestos individuales por espectrometría de masas [60-62].

Como se indicó anteriormente, hay serios problemas analíticos con los métodos de degradación química:

i) Métodos drásticos. Estos métodos están basados en reactivos fuertes que conducen a bajas producciones de los productos de diagnóstico (generación de  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{O}$ , ácido oxálico...), y

pueden producir artefactos, esto es, estructuras de nueva formación. Adicionalmente, algunas modificaciones de la composición molecular de los ensamblajes de los compuestos resultantes pueden causar la destrucción selectiva de moléculas comparativamente lábiles.

ii) Métodos suaves: Los métodos de degradación con agentes suaves llevan a producciones comparativamente menores y a un residuo insoluble (no degradado), y causa la liberación selectiva de ciertos productos libremente ligados, quizás no demasiado representativos de la macromolécula completa [3].

En general, los complejos cromatogramas con productos de la degradación de HA y sustancias tipo HA son interpretados siguiendo pasos sucesivos: i) biomarcador identificativo o los compuestos firma, ii) calculando abundancias acumulativas de familias de compuestos, iii) calculando tasas de índices entre compuestos específicos, y iv) analizando la información de series álcali (alcanos, ácidos grasos, diácidos alcanóicos...), esto es, calculando los índices de preferencia de C [compuestos con número par de C a compuestos con número impar de C] e índices reflejando la longitud de cadena (informando del origen microbiano o la acumulación alternativa de biomasa residual) [4].

#### 3.4.1. Métodos de degradación drástica

La *oxidación alcalina por permanganato* es un método clásico a pesar de ser dependiente de la temperatura [63]. Este método muestra una cierta tendencia a rendir a las ensambladuras compuestas similares de las muestras que tienen diferente composición molecular [64]. La oxidación con peróxido de hidrógeno puede llevar a algún prejuicio en la tasa aromático a alifático, pero en algunos casos es útil para materia orgánica fósil recalcitrante [9].

#### 3.4.2. La degradación con reactivos suaves

*El agua y la hidrólisis ácida* [p.ej. 6M HCl] libera carbohidratos y productos nitrogenados. *La degradación con persulfato potásico* es adecuada para el tratamiento de sustancias macromoleculares con dominios álcali dominantes, como la materia tipo húmica de lodos de depuradora compostados. Es válida para monitorizar cambios en patrones de lípidos de origen bacteriano que son estabilizados en la estructura tipo HA [65]. Otros métodos relativamente suaves es *la acidólisis con dioxano*, aplicada a materiales derivados de la lignina, útil para estudiar la transformación progresiva de unidades fenólicas. *La transesterificación con metanol trifloruro de boro* conduce a la fragmentación de poliésteres naturales. Es un método valioso para las sustancias húmicas derivadas de la biomasa subterránea (tejidos suberinizados) o sustratos basados en residuos del corcho [66]. *La despolimerización con perborato* conduce a la generación de oligómeros. Ambos pueden ser utilizados para sustancias húmicas recalcitrantes o lábiles. Pero en la mayoría de los casos este tratamiento es un consumidor de tiempo y requiere tratamientos repetidos [9]. *La degradación con tetróxido de rutenio* lleva a la liberación de compuestos álcali, en concreto aquellos atrapados o ligados covalentemente en la estructura de matrices orgánicas fósiles (humatos, lignitos cooxidados) [67]. *La degradación con óxido de cobre* conduce a la liberación de productos específicos de la lignina. Es un método muy popular para la biomasa lignocelulósica, produciendo los "fenoles de índice 12" [68].

#### 3.4.3. Pirólisis analítica

Las características apreciables de la pirólisis analítica son: i) la posibilidad de análisis directo sin preparación de muestra, ii) la generación de valiosos compuestos marcadores con un amplio rango de polaridad (álcali, aromático, nitrógeno, carbohidratos, etc...), y iii) el alto potencial degradativo (hendidura de enlaces C-C).

Las clásicas desventajas de la pirólisis analítica consisten principalmente en: i) la generación de nueva formación (incluso varias moléculas diferentes de un único compuesto), ii) el hecho de que las producciones no son necesariamente representativas y son dependientes de la temperatura, iii) la interferencia producida por pequeñas concentraciones de iones metálicos y otros minerales con un efecto catalítico en la descomposición térmica, y iv) el hecho que un residuo no degradado puede permanecer con diferente composición que la reflejada por ensamblajes de compuestos volátiles [69].

Una característica general de la pirólisis analítica es la combinación potencial con análisis numéricos en estudios quimiotaxonómicos (“toma de huellas dactilares”). En este caso no se requiere ninguna identificación obligatoria de picos cromatográficos [70]. En particular, la pirólisis tiene un gran potencial para el estudio de la lignina y sus productos de transformación: los patrones metoxifenoles son fácilmente reconocibles (sustancias tipo húmicas derivadas de la biomasa lignocelulósica), considerando que los HAs de suelos y fuentes fósiles tienden a producir, a la inversa, grandes cantidades de fenoles, catecoles y alquibencenos. La materia orgánica fósil (Leonarditas, querógenos de origen terrestre) normalmente libera grandes producciones de hidrocarburos aromáticos policíclicos alquilatados (p.ej., C<sub>0</sub>-C<sub>5</sub>) como son los naftalenos alquilatados, antracenos/fenantrenos, fluorenos, pirenos,... [71, 72].

Entre las ventajas de la pirólisis en el estudio de constituyentes no húmicos que permanecen inalterados, como los carbohidratos y los productos nitrogenados (quitina, glicopéptidos, lignoproteínas,...), está que la incidencia de estos compuestos es fácilmente detectada desde el diagnóstico de los compuestos derivados de la pirólisis (furanos, pirroles...), donde la degradación química tiende a destruir estas sustancias en CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O y productos sin significación de bajo peso molecular [59]. Esto también se aplica a la gran producción de compuestos alcalis de los residuos urbanos, principalmente lodos de depuradora [55]. En particular la tasa entre compuestos derivados de carbohidratos y compuestos derivados de lignina es útil para distinguir alguna materia orgánica originaria del suelo de la materia orgánica del compost y, en último caso, también puede ser usada como índice de madurez.

3.4.3.1. *La pirólisis en presencia de agentes alquilatantes* fue introducida como un método intermedio entre la pirólisis clásica y la degradación química húmeda. Las ventajas de la pirólisis-alquilatación son : i) la pronta liberación de productos volátiles, ii) la protección de grupos oxígeno por alquilatación, y iii) la mejora de la separación cromatográfica, la rotura de los enlaces favorecida por el efecto de la hidrólisis alcalina. Uno de los problemas clásicos de este método es la posibilidad de una generación secundaria de ácidos bencenocarboxílicos a través de desproporciones (reacciones Cannizzaro). Aparte de esto, cuando se comparan la pirólisis convencional y la termoquimiolisis, a menudo se observa un cierto perjuicio en las producciones, en algunos casos referidos como un “aumento alifático” [69, 72].

#### 3.4.4. *Métodos de degradación secuencial*

Los métodos de degradación secuencial, consistentes en el uso progresivo de reactivos suaves en la degradación de residuos del tratamiento previo, son postulados como una alternativa a los métodos anteriormente citados. Una ventaja de los métodos secuenciales es el impedimento de la formación de compuestos secundarios, mientras que se previene la destrucción selectiva del material lábil. Esto también produce la liberación selectiva de material en un sistema definido por una jerarquía de enlaces. Desde el punto de vista de la información aportada, esto se podría considerar como un tipo de reconstrucción analítica de los procesos formativos de la materia húmica. Una posible secuencia podría ser: i) la separación por disrupción ultrasónica y solventes apolares de lípidos débilmente unidos,

atrapados, ligados hidrofólicamente (¿recientemente incorporados?), ii) la aplicación sucesiva de persulfato potásico y iii) la aplicación final de permanganato potásico. Esta aproximación podría también ser útil para estudiar la especiación (refiriéndose a la distribución de cada unidad estructural en los diferentes niveles organizativos o dominios estructurales) de compuestos alifáticos y aromáticos [73, 74].

Algunos de los otros métodos de degradación secuencial pueden ser designados por la ruptura secuencial de enlaces, esto es, tratamientos con BF<sub>3</sub>-MeOH (para partir los ésteres) seguidos de tratamiento con IH (éteres, carbohidratos) y un análisis cuantitativo final por <sup>13</sup>C NMR [27].

#### 4. Consideraciones finales

La aparición de sustancias húmicas, en particular HAs, no puede ser asumida *a priori* en todo tipo de enmiendas orgánicas derivadas de residuos orgánicos (estiércoles, residuos urbanos, residuos de cosecha), incluso tras un extenso compostaje. Estas sustancias de tipo húmico pueden ser similares en términos de composición y propiedades, pero se requieren una serie de técnicas de caracterización molecular para evaluar su "verdadero carácter húmico". Es probable que las intensas interacciones de procesos abióticos en el curso de centenares de años sean requeridas para alcanzar los niveles de maduración de las sustancias húmicas encontradas en las sustancias húmicas formadas en los suelos.

En general, las sustancias húmicas de enmiendas orgánicas compostadas difieren de las sustancias húmicas del suelo por su bajo contenido en grupos funcionales conteniendo oxígeno, de dominio alifático importante, baja intensidad de color (pobre aromaticidad, baja concentración de radicales libre estables), alta hidrolizabilidad (> 50 %) con la presencia de lípidos, proteínas y carbohidratos acompañándolas. En el caso de las sustancias húmicas derivadas de los residuos lignocelulósicos el patrón de lignina es evidente, considerando que en las sustancias húmicas de residuos urbanos la firma alifática es característica, principalmente estructuras álcali (ácidos grasos, alcanos). En general, la biodegradabilidad, esto es, la estabilidad frente a la acción microbiana o el ataque enzimático, es comparable a la susceptibilidad contra la degradación química y térmica en laboratorio, por lo que las técnicas destructivas tienen un interés adicional en pronosticar la estabilidad de la materia orgánica en los suelos, la resistencia del suelo y el funcionamiento de los procesos de secuestro de carbono del suelo.

#### Referencias

- [1] Duchaufour Ph., Jacquin F. (1975). Comparaison des processus d'humification dans les principaux types d'humus forestiers. *Bull. A.F.E.S.* 1, 29–36.
- [2] Schnitzer M., Gupta U.C. (1965). Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Proc.* 1965, 274–277.
- [3] Schnitzer M., Khan S.U. (1972). *Humic Substances in the Environment*. Dekker Inc. New York.
- [4] Almendros G., Sanz J. (1992). A structural study of alkyl polymers in soil after perborate degradation of humin. *Geoderma*, 53, 79-95.
- [5] Hatcher P.G., Maciel G.E., Dennis L.W. (1981). Aliphatic structures of humic acids, a clue to their origin. *Org. Geochem.* 3, 43–48.
- [6] Hayes M.H.B., MacCarthy P., Malcolm R.L., Swift R.S. (Eds.), *Humic Substances. II. In Search of Structure*, 1989, Wiley, New York.
- [7] Stevenson F.J. (1982). Biochemistry of the formation of humic substances. In: F.J. Stevenson (Ed.) *Humus Chemistry*. 195–220.

- [8] Wershaw R.L., Pinckney D.J., Booker S.E. (1977). Chemical structure of humic acids—Part 1. A generalized structural model. *J. Research U.S. Geol. Survey* 5, 565–569.
- [9] Almendros G., Martin F., González-Vila F.J. (1987). Depolymerization and degradation of humic acids with sodium perborate. *Geoderma*, 39, 235–247.
- [10] González-Vila F.J., Lüdemann H.-D., Martín F. (1983). <sup>13</sup>C-NMR structural features of soil humic acids and their methylated, hydrolyzed and extracted derivatives. *Geoderma* 31, 3–15.
- [11] Preston C.M. (1996). Applications of NMR to soil organic matter analysis. history and prospects. *Soil Sci.* 161, 144–166.
- [12] Wilson M.A. (1981). Application of nuclear magnetic resonance spectroscopy to the study of the structure of soil organic matter. *J. Soil Sci.* 32, 167–186.
- [13] Batjes N.H. (1998). Mitigation of atmospheric CO<sub>2</sub> concentrations by increased carbon sequestration in the soil. *Biol. Fertil. Soils* 27, 230–235.
- [14] Almendros G., Sanz J., Velasco F. (1996). Signature of lipid assemblages in soils under continental Mediterranean forests. *Eur. J. Soil Sci.* 47, 183–196.
- [15] González-Vila F.J., Almendros G., Martin F. (1987). An evaluation of the differences in the composition of humic acids in soils under oak and pine forests by GC-MS after mild degradation. *Plant Soil* 103, 83–88.
- [16] Almendros G., Dorado J. (1999). Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. Structural factors related to the biodegradability of laboratory-modified humic acid preparations. *Eur. J. Soil Sci.* 50, 227–236.
- [17] Oades J.M. (1988). The retention of organic matter in soils. *Biogeochemistry* 5, 35–70.
- [18] Skjemstad J.O., Clarke P., Taylor J.A., Oades J.M., McClure S.G. (1996). The chemistry and nature of protected carbon in soil. *Aust. J. Soil Res.* 34, 251–271.
- [19] Ladd J.N., Foster R.C., Skjemstad J.O. (1993). Soil structure. carbon and nitrogen metabolism. *Geoderma* 56, 401–434
- [20] Golchin A., Oades J.M., Skjemstad J.O., Clarke P. (1994). Soil structure and carbon cycling. *Aust. J. Soil. Res.* 32, 1043–1068.
- [21] Eglinton G., Logan G.A. (1991). Molecular preservation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 333, 315–328.
- [22] Spaccini R., Conte P., Piccolo A., Haberhauer G., Gerzabek M. H. (2000). Increased soil organic carbon sequestration through hydrophobic protection by humic substances. *Proc. 10th International Meeting of the International Humic Substances Society (IHSS10)* 24–28 July. Toulouse (France) 419–419.
- [23] Merlet D. (1971). *Mise au Point Technique Concernant l'Extraction et la Caractérisation des Composés Organiques dans les Sols*. Centre de Pédologie Biologique. Doc. No. 15. Nancy, France
- [24] Basaraba J., Starkey R.L. (1966). Effect of plant tannins on decomposition of organic substances. *Soil Sci.* 101, 17–23.
- [25] Davies R.I. (1971). Relation of polyphenols to decomposition of organic matter and to pedogenetic processes. *Soil Sci.* 111, 80–85.
- [26] Lynch J.M (1976). Products of soil microorganisms in relation to plant growth. *Crit. Rev. Microbiol.* Nov., 67–107.
- [27] Almendros G., Guadalix M.E., González-Vila F.J., Martin F. (1996). Preservation of aliphatic macromolecules in soil humins. *Org. Geochem.* 24, 651–659.
- [28] Goulden J.D.S., Jenkinson D.S. (1959). Studies on the organic material extracted from soil and compost. II. The infra-red spectra of ligno-proteins isolated from compost. *J. Soil Sci.* 10, 264–270.
- [29] Holloway P.J. (1972). The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* Roth. *Chem. Phys. Lipids* 9, 158–170.

- [30] Kolattukudy P.E. (1977). Biosynthesis and degradation of lipid polymers. In *Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants*. Chapter 15. (Edited by Tevini M., Lichtenthaler H.K). Springer. Berlin, Heidelberg, New York, 271–292.
- [31] Nip M., Tegelaar E.W., de Leeuw J.W., Schenck P.A. (1986). A new non-saponifiable highly aliphatic and resistant biopolymer in plant cuticles. *Naturwissenschaften* 73, 579–585
- [32] Martin J.P., Haider K. (1971). Microbial activity in relation to soil humus formation. *Soil Sci.* 111, 54–63.
- [33] Bell A.A., Wheeler M.H. (1986). Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 24, 411–451.
- [34] Almendros G., Dorado E. (1985). Estudio de ácidos húmicos de tipo P. Distribución de los pigmentos verdes en las diferentes fracciones húmicas del suelo. *An. Edafol. Agrobiol.* XLIII (3–4), 547–559.
- [35] Haider K., Martin J.P. (1967). Synthesis and transformation of phenolic compounds by *Epicoccum nigrum* in relation to humic acid formation. *Soil Sci. Soc. Amer. Proc.* 31, 766–772.
- [36] Kumada K., Sato O. (1967). Studies on the chemical properties of P type humic acid. *Trans. Int. Symp. Humus Planta* 4, 131–133.
- [37] Carballas T., Andreux F., Jacquin F. (1971). Répartition des principaux constituants d'un végétal marqué au  $^{14}\text{C}$  dans les composés humiques d'un sol à mull. *Bull. A.F.E.S.*, 3, 29–38.
- [38] Suflita J.M., Bollag J.M. (1981). Polymerization of phenolic compounds by a soil-enzyme complex. *Soil Sci. Soc. Amer. J.* 45, 297–302.
- [39] Andreux F. (1969). Contribution à l'étude des processus de melanification des autolysats végétaux (*Juglans regia*). Thèse spécial, Nancy.
- [40] Preston C.M., Rauthan B.S. (1982). A hydrogen-1, carbon-13, and nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of *p*-benzoquinone polymers incorporating amino nitrogen compounds ("synthetic humic acids"). *Soil Sci.* 134, 227–293.
- [41] Andreux F., Golebiowska D., Chone T., Jacquin F., Metche M. (1977). Caractérisation et transformation en milieu mull d'un modèle humique issu de l'autoxydation du système catechol-glycine et marqué sélectivement au carbone-14. *5<sup>th</sup> Symposium IAEA "Soil Organic Matter Studies"*, II, 43. Vienna.
- [42] Maillard M.L.-C. (1916). Synthèse des matières humiques par action des acides aminés sur les sucres réducteurs. *Ann. Chim.* 5, 258–317.
- [43] Ellis G.P. (1959). The Maillard reaction. *Adv. Carbohydr. Chem.* 14 63–134.
- [44] Ikan R., Ioselis P., Rubinsztain Y., Aizenshtat Z., Pugmire R., Anderson L.L., Ishiwatari R. (1986). Carbohydrate origin of humic substances. *Naturwissenschaften* 73, 150–151.
- [45] Haumaier L., Zech W. (1995). Black carbon—possible source of highly aromatic components of soil humic acids. *Org. Geochem.* 23, 191–196.
- [46] Harvey G.R., Boran D.A. (1985). Geochemistry of humic substances in seawater. In: Aiken R.G., McKnight D.M., Wershaw R.L., MacCarthy P. (Eds.), *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*, Chapter 9, 233–247.
- [47] Lisanti L.E., Testini C., Senesi N. (1974). Ricerca sulle proprietà paramagnetiche dei composti umici.V. Applicazione della spettrometria EPR per la determinazione delle concentrazioni radicaliche. *Agrochimica* 18, 134–141.
- [48] Traina S.J., Novak J., Smeck, N.E. (1990). An ultraviolet absorbance method of estimating the percent aromatic carbon content of humic acids. *J. Environ. Qual.* 19, 151–153.
- [49] Chen Y., Senesi, N., Schnitzer, M. (1977). Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41, 352–358.
- [50] Kumada K., Hurst H.M. (1967). Green humic acid and its possible origin as a fungal metabolite. *Nature* 214, 631–633.

- [51] McCarthy P., Rice J.A. (1985). Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. In: Aiken G.R. et al. (Eds.) *Humic Substances in Soil, Sediment, and Water*, Wiley, New York, pp. 527–559.
- [52] Marton J., Sparks H.E. (1967). Determination of lignin in pulp and paper by infrared multiple internal reflectance. *Tappi J.* 50, 363–368.
- [53] Miralles I., Ortega R., Sánchez-Marañón M, Soriano M., Almendros G. (2007). Assessment of biogeochemical trends in soil organic matter sequestration in Mediterranean calcimorphic mountain soils (Almería, Southern Spain). *Soil Biol. Biochem.* 39, 2459–2470.
- [54] Huc C., Durand B., Jacquin F. (1974). Caractérisation des acides humiques de sédiments marins récents et comparaison avec leurs homologues terrestres. *Bull. ENSAIA*, 16, 1/2 59–75.
- [55] Almendros G., Martínez A.T., González A.E., Martín F., González-Vila F.J. (1990). Pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry of yeasts from the genera *Cryptococcus* and *Rhodothorula* isolated from rotted wood. *Mycol. Res.* 94, 211–218.
- [56] Fründ R., Lüdemann H.-D., González-Vila F.J., Almendros G., del Rio J.C. Martín F. (1989). Structural differences between humic fractions from different soil types as determined by FT-IR and <sup>13</sup>C NMR studies. *Sci. Total Environ.*, 81/82, 187–194.
- [57] Knicker H., Almendros G., González-Vila F.J., González-Pérez J.A., Polvillo O. (2006). Characteristic alterations of quantity and quality of soil organic matter caused by forest fires in continental Mediterranean ecosystems. a solid-state C-13 NMR study. *Eur. J. Soil Sci.* 57, 558–569.
- [58] Knicker H., Almendros G., González-Vila F.J., Lüdemann H.-D., Martín F. (1996). <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N NMR analysis of some fungal melanins in comparison with soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 23, 1023–1028.
- [59] González-Vila F.J., Almendros G., Madrid, F. (1999). Molecular alterations of organic fractions from urban waste in the course of composting and their further transformation in amended soil. *Sci. Total Environ.* 236, 215–299.
- [60] Neyroud J.A. and Schnitzer M. 1975. The mild degradation of humic substances. *Agrochimica* (19).2 116-126.
- [61] Griffith S.M. and Schnitzer M. 1975. Oxidative degradation of humic and fulvic acids extracted from tropical volcanic soils. *Can. J. Soil Sci.* (55) 251-267.
- [62] Maximov O.B., Shvets T.V. and Elkin Yu. N. 1977. On permanganate oxidation of humic acids. *Geoderma* 19 63-78.
- [63] Schnitzer M. 1978. On permanganate oxidation of humic acids- a discussion. *Geoderma* 21 239-243.
- [64] Almendros G., González-Vila F.J., Martín F. (1989). Room temperature alkaline permanganate oxidation of representative humic acids. *Soil Biol. Biochem.* 21, 481–486.
- [65] Matsuda K. and Schnitzer M. 1972. The permanganate oxidation of humic acids extracted from acid soils. *Soil Sci.* (114) 185-193.
- [66] Martín F., Saíz-Jiménez C., González-Vila F.J. (1981). The persulfate oxidation of a soil humic acid. *Soil Sci.* 132, 200–203
- [67] Almendros G., Sanz J. (1991). A structural study on the soil humin fraction.- Boron trifluoride-methanol transesterification of soil humin preparations. *Soil Biol. Biochem.* 23, 1147–1154.
- [68] González-Vila F.J., del Rio J.C., Almendros G., Martín F. (1994). Structural assessment of humic fractions from different soils through <sup>13</sup>C NMR spectroscopy and ruthenium tetroxide oxidation. In: Senesi N., Miano T.M. (Eds.) *Humic Substances in the Global Environment and Implications in Human Health*. Elsevier Science B.V., 293–298.
- [69] Hedges J.I. and Ertel J.R. 1982. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. *Anal. Chem.* 54 174-178.
- [70] Martín F., Verdejo T., González-Vila F.J., Almendros G. (1999). Experimental reappraisal of flash pyrolysis and low-temperature thermochemolysis using tetramethylammonium

- hydroxide for the molecular characterization of humic acids. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 61, 133–145.
- [71] Almendros G., Leal J.A., González-Vila F.J., Martín F. (1990). The effect of composting on the chemical composition of the organic colloidal fraction from domestic sewage sludge. *Lect. Notes Earth Sci.* 33, 205–216.
- [72] Tinoco P., Almendros G., González-Vila F.J. (2002). Impact of the vegetation on the lignin pyrolytic signature of soil humic acids from Mediterranean soils. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* 64, 407–420.
- [73] Almendros G., González-Vila F.J., Martín F., Sanz J., Álvarez-Ramis C. (1998). Appraisal of pyrolytic techniques on different forms of organic matter from Cretaceous basement in Central Spain. *Org. Geochem.* 28, 613–623.
- [74] Almendros G., González-Vila F.J. (1987). Degradative studies on a soil humin fraction. Sequential degradation of inherited humin. *Soil Biol. Biochem.* 19, 513–520.
- [75] Zancada M.C., Almendros G., Sanz J., Román R. (2004). Speciation of lipids and humus-like colloidal compounds in a forest soil reclaimed with municipal solid waste compost. *Waste Manage. Res.* 22, 23–24.

