



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

CAMPUS D'ALCOI

# UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

## Escuela Politécnica Superior de Alcoy

Uso de residuos de alperujo como fuente de complejantes de hierro para un posible uso en fertilización de cultivos

Trabajo Fin de Grado

Grado en Ingeniería Química

AUTOR/A: Martínez Serrano, Nerea

Tutor/a: Santos-Juanes Jordá, Lucas

Cotutor/a externo: AREVALO AGUADO, JORDI

CURSO ACADÉMICO: 2022/2023



## Resumen

En la actualidad, uno de los temas ambientales más preocupantes es el cambio climático, este es producido por el aumento de las temperaturas debido a la constante actividad del ser humano; la creciente industria provoca el aumento de los gases de efecto invernadero debido a la fabricación, transporte y consumo insostenible.

Por lo que se promueve la implantación de una economía circular, para tomar conciencia de que los recursos del planeta son limitados y que se deben revalorar todos aquellos residuos que en lugar de ser desechados puedan ser utilizados en otros aspectos. Como es el caso de este proyecto, en el que se estudia la utilización de los residuos de las almazaras, el alperujo, como posible fertilizante gracias a la complejación de las sustancias húmicas con el hierro.

Se realizaron ensayos a diferentes pH para determinar cuál de ellos era el mejor para la extracción de sustancias tipo húmicas, concluyendo con que el pH óptimo para este proyecto era el pH más alcalino estudiado, pH 13; ya que con pH inferiores no se extraen sustancias húmicas. Además, para comprobar la eficacia de estos extractos como fertilizantes se realizaron ensayos de germinación con semillas.

Finalmente se llevó a cabo el dimensionado a nivel industrial de este proyecto, con el objetivo de calcular si era rentable la realización de este proyecto a gran escala e implementarlo para la reducción de residuos de este tipo. Pero gracias a este estudio se concluyó que no es viable ejecutar este proyecto, debido a los altos costes de extracción.

**Palabras clave:** alperujo; sustancias húmicas; complejo; extractos; fertilizantes

## Resum

En l'actualitat, un dels temes ambientals més preocupants és el canvi climàtic, aquest és produït per l'augment de les temperatures a causa de la constant activitat de l'ésser humà; la creixent indústria provoca l'augment dels gasos d'efecte hivernacle degut a la fabricació, el transport i el consum insostenible.

Per això es promou la implantació d'una economia circular, per prendre consciència que els recursos del planeta són limitats i que s'han de revalorar tots aquells residus que en lloc de ser rebutjats podrien ser utilitzats en altres aspectes. Com és el cas d'aquest projecte, en el qual s'estudia la utilització dels residus de les almàsseres, l'alperujo, com a possible fertilitzant gràcies a la complexació de les substàncies húmiques amb el ferro.

Es van realitzar assajos a diferents pH per determinar quin era el millor per a l'extracció de substàncies tipus húmiques, conclouent que el pH òptim per a aquest projecte era el pH més alcalí estudiat, pH 13; ja que amb pH inferiors no s'extreuen substàncies húmiques. A més, per comprovar l'eficàcia d'aquests extractes com a fertilitzants es van fer assajos de germinació amb llavors.

Finalment es va dur a terme el dimensionat a nivell industrial d'aquest projecte, amb l'objectiu de calcular si era rendible la realització d'aquest projecte a gran escala i implementar-lo per a la reducció de residus d'aquest tipus. Però gràcies a aquest estudi es va concloure que no és viable executar aquest projecte, a causa dels costos d'extracció alts.

Paraules clau: alperujo; substàncies húmiques; complex; extractes; fertilitzants

## Abstract

Currently, one of the most worrying environmental issues is climate change, this is produced by the increase in temperatures due to the constant activity of the human being; the growing industry causes the increase of greenhouse gases due to unsustainable manufacturing, transportation and consumption.

Therefore, the implementation of a circular economy is promoted, to become aware that the planet's resources are limited and that all waste should be reevaluated so that instead of being discarded, it can be used in other ways. Such is the case of this project, which studies the use of olive oil mill waste, alperujo, as a possible fertilizer thanks to the complexation of humic substances with iron.

Tests were carried out at different pH levels to determine which of them was the best for the extraction of humic substances, concluding that the optimum pH for this project was the most alkaline pH studied, pH 13, since humic substances are not extracted at lower pH. In addition, to test the effectiveness of these extracts as fertilizers, seed germination tests were carried out.

Finally, the industrial dimensioning of this project was carried out, with the aim of calculating whether it was profitable to carry out this project on a large scale and to implement it for the reduction of waste of this type. But thanks to this study it was concluded that it is not feasible to implement this project due to the high extraction costs.

**Keywords:** alperujo; humic substances; complex; extracts; fertilizers.

# Contenido

Resumen .....	2
Resum .....	3
Abstract.....	4
Listado de figuras .....	9
Listado de tablas .....	11
Índice de abreviaturas .....	13
1. Introducción.....	14
1.1. La importancia de una economía circular .....	15
1.2. Fertilizantes químicos .....	17
1.3. Nutrición férrica y fertilizantes que aportan hierro .....	19
1.3.1. Estrategia I .....	21
1.3.2. Estrategia II .....	21
1.4. Fertilizantes orgánicos de hierro.....	23
1.5. Complejos de hierro con sustancias húmicas .....	25
1.5.1. Extracción .....	27
1.5.2. Fraccionamiento .....	28
1.5.3. Purificación .....	28
1.6. Alperujo como fuente de sustancias tipo húmicas .....	29
2. Objetivos.....	32
3. Parte experimental .....	34
3.1. Reactivos .....	34
3.1.1. Alperujo .....	34
3.1.2. Hidróxido de potasio.....	34
3.1.3. Agua destilada .....	34
3.1.4. Hidróxido sódico .....	35
3.1.5. Ácido sulfúrico .....	35
3.1.6. Cloruro férrico hexahidratado .....	36
3.1.7. Tampón acético .....	37
3.1.8. O- Fenantrolina .....	37
3.1.9. Ácido ascórbico.....	37
3.1.10. Sodio cloruro.....	38
3.1.11. Ácido nítrico.....	38

3.1.12.	Bioestimulante comercial .....	39
3.1.13.	Semillas .....	39
3.2.	Materiales .....	39
3.2.1.	Balanza digital .....	39
3.2.2.	Filtro fibra de vidrio .....	40
3.2.3.	Filtro poliamida .....	40
3.2.4.	Cubetas de cuarzo.....	41
3.2.5.	Micropipetas .....	42
3.2.6.	Filtro cuantitativo .....	42
3.2.7.	Placas Petri.....	43
3.2.8.	Agitador mecánico rotativo .....	43
3.3.	Equipos.....	44
3.3.1.	Estufa .....	44
3.3.2.	pH-metro .....	44
3.3.3.	Bomba de vacío.....	45
3.3.4.	Carbono orgánico total (TOC) .....	45
3.3.5.	Dispersión de luz dinámica (DLS) .....	47
3.3.6.	Espectrofluorómetro .....	47
3.3.7.	Espectrofotómetro .....	48
3.3.8.	Demanda química de oxígeno (DQO) .....	48
3.3.9.	Incubadora .....	49
3.3.10.	Caja de luz.....	49
3.3.11.	Calorimetría diferencial de barrido (DSC).....	50
3.3.12.	Análisis elemental.....	50
3.4.	Procedimiento experimental .....	50
3.4.1.	Humedad muestras.....	50
3.4.2.	Preparación extracciones.....	51
3.4.3.	Estudios muestras.....	53
3.4.3.1.	Método de la orto-fenantrolina.....	53
3.4.4.	Ensayo de germinación .....	55
3.5.	Cálculos .....	59
3.5.1.	Humedad .....	59
3.5.2.	Masa de KOH .....	60

3.5.3.	Volumen extractos.....	62
3.5.3.1.	Volumen extracto a pH 9 .....	62
3.5.3.2.	Volumen extracto a pH 11 .....	62
3.5.3.3.	Volumen extracto a pH 13 .....	62
3.5.4.	Masa FeCl <sub>3</sub> .....	62
3.5.5.	Masa NaCl .....	63
3.5.6.	Masa bioestimulante .....	63
4.	Resultados.....	65
4.1.	Caracterización de los residuos.....	65
4.1.1.	Porcentaje de humedad.....	65
4.1.2.	Porcentaje de carbono.....	65
4.1.3.	Análisis alperujo.....	66
4.2.	Caracterización de los extractos .....	67
4.2.1.	TOC: Carbono orgánico total .....	67
4.2.2.	DLS: Dispersión de luz dinámica .....	67
4.2.3.	Fluorescencia .....	68
4.2.4.	Capacidad complejante: Ensayo o-fenantrolina .....	71
4.2.5.	Capacidad bioestimulante: Ensayo de germinación .....	73
4.2.5.1.	Capacidad de germinación.....	74
4.2.5.2.	Velocidad de germinación (V <sub>g</sub> ).....	77
4.2.5.3.	Índice Timpson (It) .....	81
4.2.5.4.	Coefficiente de uniformidad (Cu).....	83
5.	Escalado industrial .....	87
6.	Viabilidad económica.....	93
6.1.	Presupuesto de inversión inicial .....	93
6.1.1.	Gasto de inversión .....	99
6.2.	Presupuesto de explotación.....	100
6.2.1.	Costes fijos .....	100
6.2.1.1.	Costes de personal.....	100
6.2.1.2.	Coste de amortización .....	101
6.2.1.3.	Costes de mantenimiento.....	102
6.2.2.	Costes variables .....	103
6.2.2.1.	Costes energéticos.....	103

6.2.2.2.	Coste del agua.....	104
6.2.2.3.	Material empleado .....	104
6.2.3.	Costes totales.....	105
6.3.	Beneficios.....	106
6.3.1.	VAN .....	106
6.3.2.	TIR .....	107
7.	Conclusiones .....	109
	Bibliografía .....	110

## Listado de figuras

Figura 1: Emisiones GEI 2021 por sector en España <sup>[4]</sup> .....	15
Figura 2: Emisiones GEI 2021 por tipo en España <sup>[4]</sup> .....	15
Figura 3: Economía lineal frente economía circular <sup>[10]</sup> .....	17
Figura 4: Comparativa de una planta que no absorbe los nutrientes primarios, secundarios y micronutrientes del suelo frente a una que si lo hace <sup>[19]</sup> .....	20
Figura 5: Síntoma déficit de Fe, de izquierda a derecha, amarilleamiento de las hojas <sup>[18]</sup> .....	20
Figura 6: Estrategia I mecanismo de absorción de Fe <sup>[21]</sup> .....	21
Figura 7: Estrategia II mecanismo de absorción de Fe <sup>[21]</sup> .....	22
Figura 8: Coloración de las sustancias húmicas (Stevenson 1982) .....	26
Figura 9: Balanza analítica .....	40
Figura 10: Balanza de precisión .....	40
Figura 11: Filtros fibra de vidrio .....	40
Figura 12: Etiquetado filtros poliamida .....	41
Figura 13: Filtros poliamida .....	41
Figura 14: Caja cubetas de cuarzo .....	42
Figura 15: Cubetas de cuarzo.....	42
Figura 16: Caja filtros cuantitativos.....	42
Figura 17: Filtro cuantitativo dentro de Placa Petri.....	42
Figura 18: Placa Petri <sup>[37]</sup> .....	43
Figura 19: Agitador mecánico rotativo.....	44
Figura 20: Estufa.....	44
Figura 21: pH-metro.....	45
Figura 22: Bomba de vacío.....	45
Figura 23: Motor bomba de vacío.....	45
Figura 24: TOC líquido.....	46
Figura 25: TOC sólido.....	46
Figura 26: DLS.....	47
Figura 27: Fluorímetro.....	48
Figura 28: Espectrofotómetro.....	48
Figura 29: Termorreactor y espectrofotómetro para la medida de la DQO.....	49
Figura 30: Incubadora.....	49
Figura 31: Caja de luz.....	50
Figura 32: Montaje experimental: Bomba de vacío y matraz y embudo Büchner.....	52
Figura 33: Embudo y matraz Büchner.....	52
Figura 34: Diagrama del estado del hierro en función del pH <sup>[47]</sup> .....	54
Figura 35: Semillas bañadas en sustrato.....	56
Figura 36: Preparación Placa Petri.....	57
Figura 37: Placas Petri ensayo.....	57
Figura 38: Secado semillas en sustrato salino, de alperujo y de bagazo.....	57
Figura 39: Secado semillas en sustrato comercial y agua.....	57
Figura 40: Colocación semillas riego agua destilada.....	58

<i>Figura 41: Colocación semillas riego agua salada</i> .....	58
<i>Figura 42: Regiones emisores típicas de DOM fluorescente<sup>[51]</sup></i> .....	68
<i>Figura 43: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 9</i> .....	69
<i>Figura 44: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 11</i> .....	70
<i>Figura 45: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 13</i> .....	70
<i>Figura 46: Estabilidad pH 5</i> .....	72
<i>Figura 47: Estabilidad pH 6</i> .....	72
<i>Figura 48: Estabilidad pH 7</i> .....	73
<i>Figura 49: Gráfico de barras capacidad de germinación</i> .....	76
<i>Figura 50: Gráfico de dispersión capacidad de germinación</i> .....	77
<i>Figura 51: Gráfico de barras coeficiente de velocidad de germinación (Vg%)</i> .....	80
<i>Figura 52: Gráfico de barras coeficiente velocidad de germinación relativa (Vg%)</i> .....	81
<i>Figura 53: Gráfico de barras Índice Timpson (It)</i> .....	83
<i>Figura 54: Gráfico de barras Coeficiente de uniformidad (Cu)</i> .....	86
<i>Figura 55: Etiqueta fertilizante comercial<sup>[52]</sup></i> .....	92
<i>Figura 56: Bomba de trasiego</i> .....	94
<i>Figura 57: Reactor tanque agitado</i> .....	95
<i>Figura 58: Agitador en espiral</i> .....	95
<i>Figura 59: Bomba neumática</i> .....	96
<i>Figura 60: Filtro de gruesos</i> .....	97
<i>Figura 61: Filtro finos</i> .....	98
<i>Figura 62: Contendor 1000L</i> .....	99

## Listado de tablas

Tabla 1: Características KOH.....	34
Tabla 2: Características NaOH .....	35
Tabla 3: Características H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	36
Tabla 4: Características FeCl <sub>3</sub> .....	36
Tabla 5: Características CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub> .....	37
Tabla 6: Características CH <sub>3</sub> COOH .....	37
Tabla 7: Características o-fenantrolina.....	37
Tabla 8: Características C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub> .....	37
Tabla 9: Características NaCl .....	38
Tabla 10: Características HNO <sub>3</sub> .....	38
Tabla 11: Datos humedad .....	60
Tabla 12: Cálculo humedad.....	60
Tabla 13: Datos FeCl <sub>3</sub> .....	63
Tabla 14: Porcentaje de humedad total.....	65
Tabla 15: Porcentaje de carbono .....	65
Tabla 16: Análisis alperujo .....	66
Tabla 17: Análisis elemental alperujo .....	66
Tabla 18: Valores TOC.....	67
Tabla 19: Valores DLS .....	68
Tabla 20: Acrónimos cultivos ensayo de germinación .....	74
Tabla 21: Capacidad de germinación Control .....	74
Tabla 22: Capacidad de germinación Alperujo .....	75
Tabla 23: Capacidad de germinación Comercial.....	75
Tabla 24: Capacidad de germinación Control Salino .....	75
Tabla 25: Capacidad de germinación Alperujo Salino .....	75
Tabla 26: Capacidad de germinación Comercial Salino .....	76
Tabla 27: Porcentaje de mejora capacidad de germinación 144h.....	77
Tabla 28: Vg (%) Control .....	78
Tabla 29: Vg (%) Alperujo .....	78
Tabla 30: Vg (%) Comercial .....	79
Tabla 31: Vg (%) Control Salino.....	79
Tabla 32: Vg (%) Alperujo Salino.....	79
Tabla 33: Vg (%) Comercial Salino .....	80
Tabla 34: Índice Timpson Control.....	81
Tabla 35: Índice Timpson Alperujo.....	82
Tabla 36: Índice Timpson Comercial .....	82
Tabla 37: Índice Timpson Control Salino .....	82
Tabla 38: Índice Timpson Alperujo Salino .....	82
Tabla 39: Índice Timpson Comercial Salino.....	83
Tabla 40: Coeficiente de uniformidad Control .....	84
Tabla 41: Coeficiente de uniformidad Alperujo .....	84

<i>Tabla 42: Coeficiente de uniformidad Comercial</i> .....	84
<i>Tabla 43: Coeficiente de uniformidad Control Salino</i> .....	85
<i>Tabla 44: Coeficiente de uniformidad Alperujo Salino</i> .....	85
<i>Tabla 45: Coeficiente de uniformidad Comercial Salino</i> .....	85
<i>Tabla 46: Características de la bomba de trasiego</i> .....	93
<i>Tabla 47: Características reactor</i> .....	94
<i>Tabla 48: Características de la bomba neumática</i> .....	95
<i>Tabla 49: Características filtro grueso</i> .....	96
<i>Tabla 50: Características filtro finos</i> .....	97
<i>Tabla 51: Características contenedor 1000L</i> .....	98
<i>Tabla 52: Gastos inversión inicial</i> .....	99
<i>Tabla 53: Coste total personal</i> .....	101
<i>Tabla 54: Costes fijos al mes</i> .....	102
<i>Tabla 55: Costes fijos en 4 meses</i> .....	103
<i>Tabla 56: Coste energético</i> .....	103
<i>Tabla 57: Costes variables al mes</i> .....	105
<i>Tabla 58: Costes variables en 4 meses</i> .....	105

## Índice de abreviaturas

- GEI:** Gases de efecto invernadero
- Fe- SH:** Hierro- sustancias húmicas
- EPR:** Extra Pure
- ODS:** Objetivos de desarrollo sostenible
- M:** Molaridad
- n:** Moles
- V:** Volumen
- M<sub>r</sub>:** Peso molecular
- m:** Masa
- ρ:** Densidad
- C:** Concentración
- TOC/ TN:** Carbono orgánico total
- DLS:** Dispersión de luz dinámica
- DQO:** Demanda química de oxígeno
- DSC:** Calorimetría diferencial de barrido
- DOM:** Materia orgánica disuelta
- Ty- L:** Tirosina
- Try- L:** Triptófano
- MH:** Húmico microbiano
- HLS:** Húmicos
- FA:** Ácidos fúlvicos
- VAN:** Valor actual neto
- TIR:** Tasa interna de retorno

# 1. Introducción

El calentamiento global es una de las principales consecuencias de las actividades humanas y se ha convertido en uno de los temas ambientales más importantes hoy en día. Este se produce cuando la superficie terrestre absorbe la energía solar, aumentando así la temperatura media superficial de la tierra. Provocando el cambio climático, ya que al aumentar la temperatura media de la tierra los patrones meteorológicos de cada lugar se ven afectados; este nuevo calor gira conforme la rotación de la tierra, recogiendo la humedad de los océanos, aumentando en unas zonas y asentándose en otras y cambiando el ritmo del clima asentado en cada lugar.

El aumento de la temperatura se produce por la acumulación de gases de efecto invernadero (GEI) como el vapor de agua, el metano, el óxido nitroso, el ozono, el dióxido de carbono y los gases fluorados. Gracias a estos gases la tierra es un lugar adecuado para la vida, ya que sino la temperatura disminuiría mucho; el problema es cuando la cantidad de gases de efecto invernadero aumenta notablemente produciéndose el calentamiento global. <sup>[1]</sup>

Los niveles de gases de efecto invernadero han aumentado y descendido a lo largo de la historia de la Tierra debido a eventos naturales como la variación en la radiación solar emitida por el sol o por la variación de la incidencia en la tierra o por las erupciones volcánicas. Pero en los últimos años estos niveles se han visto en aumento debido a las emisiones antropogénicas; a través de la quema de combustibles fósiles, la agricultura y la deforestación. <sup>[2]</sup>

La emisión de estos gases se puede identificar y cuantificar, esto es conocido como la huella de carbono, que representa el volumen total de gases de efecto invernadero procedentes de las actividades de los seres humanos. Se expresa en toneladas de CO<sub>2</sub> emitidas, y conocer su valor es importante para tomar medidas y poder gestionarla, poniendo en marcha iniciativas.<sup>[3]</sup> El gas de efecto invernadero predominante y más peligroso es el dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>), este tiene un ciclo de vida largo y prevalece en la atmósfera durante décadas o siglos; por lo que es el más contribuye al calentamiento global. <sup>[1]</sup>

Ahora el ser humano ha aumentado más de un tercio la cantidad de dióxido de carbono en la atmósfera desde la revolución industrial, produciendo cambios significativos en cuestión de décadas. Esto se debe a la gran cantidad de actividades realizadas que producen gases de efecto invernadero durante la fabricación, el transporte y el consumo. <sup>[1]</sup>

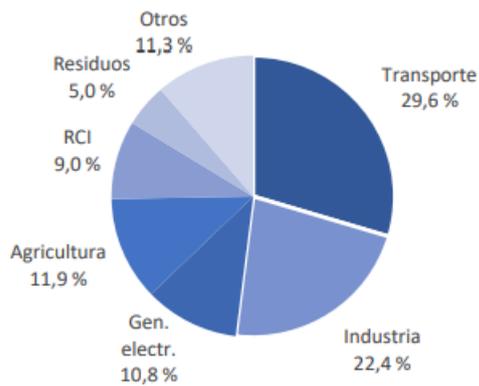


Figura 1: Emisiones GEI 2021 por sector en España<sup>[4]</sup>

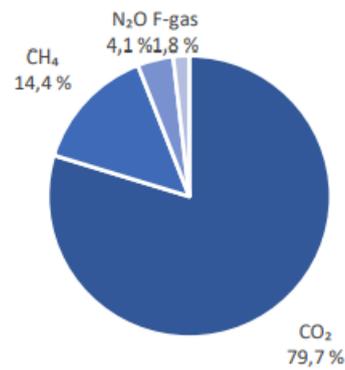


Figura 2: Emisiones GEI 2021 por tipo en España<sup>[4]</sup>

## 1.1. La importancia de una economía circular

El modelo económico tradicional es el lineal, y este se basa en que para la fabricación de productos se extraen materias primas, se produce y luego se desecha; por lo que el patrón actual de producción y consumo está generando una crisis ambiental en cuanto a escasez de recursos y excedente de desechos. Además de que con este modelo económico no se tiene en cuenta la huella de carbono que se genera. <sup>[5]</sup>

Los recursos del planeta Tierra son limitados, los combustibles fósiles, como son el petróleo, el gas natural o el carbón, se tratan de fuentes energéticas de origen no renovable, que suministran alrededor del 80 % de la energía mundial, proporcionando calor, transporte y electricidad, además de suministrar energía para los procesos de fabricación y consumo. Pero el uso excesivo de estos recursos conlleva un agotamiento de estos, provocándose una escasez de recursos por lo que la economía se detendría al no poder abastecer las necesidades de la sociedad.

Además de que el empleo de los combustibles fósiles al ser quemados, liberan dióxido de carbono y otros gases de efecto invernadero que, a su vez, atrapan el calor en la atmósfera terrestre, transformando estos gases en los principales responsables del calentamiento global y del cambio climático. <sup>[6]</sup>

Por lo que este tipo de economía no es sustentable ambientalmente, ya que prioriza el beneficio económico y busca la fabricación rápida de los productos con la finalidad de ser usados y tirados, ya que confía en la disposición de grandes cantidades baratas y fáciles de conseguir materiales y energía, además de medios baratos y más fáciles para deshacerse de aquellos productos que ya no son de interés o que ya no satisfacen las necesidades individuales y sociales; adoptando así unos patrones de consumo insostenibles. Pero este modelo no es el único posible, por lo que se presentan alternativas mucho más sostenibles y amigables con el medio ambiente. <sup>[7]</sup>

El modelo económico alternativo es el circular, economía circular; este modelo se diferencia del lineal en que no se basa en extraer, fabricar, consumir y tirar; si no que propone un ciclo de desarrollo continuo que preserva y aumenta el conjunto de recursos naturales renovables y no renovables del planeta tierra. Optimizando así los rendimientos de los recursos empleados y minimizando los efectos negativos como la huella de carbono, la escasez de recursos y el aumento de desechos. [8]

El objetivo de esta economía es que los materiales, los recursos y los productos se mantengan dentro de la economía el mayor tiempo posible, reduciendo así al mínimo la generación de residuos. Por ello se basa en rediseñar, reducir, reutilizar, reparar, renovar, recuperar y reciclar todas las veces que sea posible para crear así un valor añadido a los residuos.

El concepto de rediseñar consiste en el diseño y fabricación de productos teniendo en cuenta el medio ambiente y el impacto que se puede generar en él; por lo que se estudian materiales y diseños sostenibles. El de reducir se refiere al consumismo masivo que se sufre, por lo que se debe reducir la cantidad de productos consumidos y la cantidad de residuos generados. Reutilizar es un paso también muy importante, pues se consigue alargar la vida útil de los productos, frenando así la producción masiva de residuos. Reparar se basa en aprovechar los recursos de los que ya se disponen pero que no funcionan, reparándolos para que vuelvan a cumplir su función. La recuperación de productos consiste en reintroducir materiales ya empleados en el proceso de producción, dándole así una segunda vida útil. Renovar es emplear objetos antiguos dando la función para la que fueron creados.

Por último, el reciclaje, este consiste en convertir los residuos en recursos; es decir, consiste en transformar los desechos en materias primas para crear nuevos productos o emplearlos como nueva materia en otras industrias. De esta manera, se valorizan los residuos y se reduce la cantidad de desechos, fomentando una economía circular sostenible para el planeta. [9]

Por lo que este modelo económico posee diversos beneficios como son: [8]

- La protección del medio ambiente, reduciendo las emisiones de gases de efecto invernadero, minimizando el consumo de recursos naturales y disminuyendo la generación de residuos.
- La reducción del uso de materias primas, favoreciendo la independencia de recursos no renovables y promoviendo el uso de fuentes renovables.
- Beneficia la economía local, fomentando modelos de producción basados en la reutilización de residuos cercanos como materia prima, por lo que también fomenta el empleo.



Figura 3: Economía lineal frente economía circular<sup>[10]</sup>

De esta forma podríamos indicar que las diferencias fundamentales entre la economía lineal y la circular es que la primera se centra en la rentabilidad sin preocuparse por el ciclo de vida del producto y la segunda apuesta por la sostenibilidad y la fabricación de productos que suponga la minimización de la energía utilizada y que esta provenga de fuentes renovables, además del uso de materias primas no contaminantes, que puedan ser reciclables, de vida útil ilimitada y con la posibilidad de reparación. <sup>[10]</sup>

## 1.2. Fertilizantes químicos

La creciente necesidad de alimentos para satisfacer la actual sociedad de consumo exige una gran cantidad de suelo agrícola para conseguir la máxima eficiencia y calidad del producto, por lo que los fertilizantes químicos juegan un papel esencial en la mejora de la productividad de los cultivos y la fertilidad del suelo agrícola. <sup>[11]</sup>

Pero asegurar un alto mantenimiento de la producción y la fertilidad del suelo es complicado debido a la gestión de la salud del suelo, donde se encuentran problemas como el bajo contenido de carbono en el suelo, la baja eficiencia en el uso de los fertilizantes y el existente desequilibrio entre los nutrientes que se añaden al suelo y los que son eliminados. La gestión de la salud del suelo agrícola es de gran importancia para asegurar una producción agrícola sostenible y el sustento de la biodiversidad, por lo que la agricultura moderna depende de los fertilizantes, los pesticidas, el riego asegurado, herbicidas y semillas con mejoras; para así aumentar su producción. <sup>[12]</sup>

Los fertilizantes químicos se tratan de compuestos hechos por el hombre que aportan a los cultivos la gran concentración de nutrientes necesarios para el crecimiento de las plantas. Estos fertilizantes no orgánicos principalmente contienen sales de fosfato, nitrato, amonio y potasio; además de metales pesados, como el cadmio y cromo, y altas concentraciones de

radionúclidos, que liberan radiación a medida que se descomponen de forma natural, como el uranio- 238 o el polonio- 210. <sup>[11]</sup>

Existen tres tipos de fertilizantes químicos:

- Fertilizante nitrogenado:

Este fertilizante se emplea para complementar la deficiencia de nitrógeno tanto a las plantas como a la tierra, por lo que es el fertilizante más beneficioso para la planta. Se usa para impulsar el crecimiento de las plantas y además fomentar la estructura celular. <sup>[13]</sup> Se presenta en forma de nitrógeno amoniacal, de nitrógeno de amida o como nitrato- nitrógeno. <sup>[11]</sup>

- Fertilizante de fósforo:

Este fertilizante se usa para ayudar a la planta a formar nuevas raíces, producir semillas, frutos y flores. <sup>[14]</sup> Se presenta como fosfato. <sup>[11]</sup>

- Fertilizante de potasio:

Este fertilizante se emplea para la formación de carbohidratos en las plantas y que así tengan un crecimiento saludable. Se presenta en dos formas, la no clorurada y la clorurada, es decir, el sulfato de potasa y el cloruro de potasio, respectivamente. <sup>[11]</sup>

Los fertilizantes químicos tienen un importante papel en la mejora de la productividad de los cultivos y la fertilidad del suelo, pero sus efectos problemáticos no se pueden ignorar ya que también alteran las propiedades fisicoquímicas y biológicas del suelo.

La fertilización es la responsable de la acumulación de metales pesados en el suelo, ya que es la principal fuente de metales pesados y radionúclidos, al contener metales como el cadmio, el arsénico o el plomo, y radionúclidos, que dan como resultado la acumulación de contaminantes inorgánicos. Además, también, la utilización continua de fertilizantes no orgánicos es responsable de la disminución del contenido de materia orgánica del suelo, que conlleva la disminución de la calidad del suelo agrícola.

Un uso excesivo de fertilizantes químicos conlleva el endurecimiento del suelo, la contaminación del aire y el agua, además de la del propio suelo; disminuye la fertilidad del suelo y se reduce la concentración de nutrientes y minerales importantes, lo que provoca peligros para el medio ambiente, además de un incremento de las emisiones de gases de efecto invernadero. También conduce a una débil actividad microbiana en el suelo agrícola, a alteraciones del pH, a acidificaciones y alteraciones en la costra biológica del suelo, con lo que la carga de materia orgánica, de humus y de organismos útiles disminuye; por lo que hay un aumento de plagas y el crecimiento de los productos se retrasa. <sup>[12]</sup>

Todos estos efectos adversos influirán en la biodiversidad del suelo agrícola alterando su bienestar debido a su larga persistencia en él<sup>[12]</sup>, provocando que la agricultura sea uno de los mayores productores de gases de efecto invernadero, debido al uso excesivo de fertilizantes, los cuales contienen óxido nitroso y este tiene un elevado potencial productor de GEI; además de por la degradación de suelos y el uso de terrenos antes forestales.<sup>[15]</sup>

### 1.3. Nutrición férrica y fertilizantes que aportan hierro

Para que las plantas se desarrollen necesitan del aporte de las cantidades suficientes de nutrientes, conocidos como elementos esenciales; de estos elementos tan solo el carbono, el oxígeno y el hidrógeno serán aportados por el aire; el resto son suministrados por el suelo, por lo que los fertilizantes químicos tienen un papel importante aportando a las plantas sus principales macronutrientes, y una serie de micronutrientes y aditivos.

Los nutrientes primarios o macronutrientes son los nutrientes que las plantas requieren en cantidades adecuadas para su desarrollo y crecimiento óptimo. Estos elementos son el nitrógeno, fósforo y el potasio, que son los responsables de numerosos procesos esenciales para las plantas, influenciando en su crecimiento, fructificación y floración.

Los nutrientes secundarios son aquellos que necesitan las plantas en cantidades moderadas, son el calcio, magnesio y azufre; y son responsables de diversas reacciones enzimáticas.

Por último, los micronutrientes, son los que se requieren en cantidades mínimas, pero son igual de esenciales que los nutrientes primarios. Este grupo está compuesto por el cobre, el hierro, el manganeso, el molibdeno o vanadio, el zinc, el boro, el silicio y el cobalto; cada uno con diversas funciones vitales para el crecimiento de la planta.<sup>[12]</sup>

El hierro es un elemento esencial para las plantas ya que interviene en numerosas funciones biológicas formando parte de enzimas ya que sirve como cofactor en la transferencia de electrones u oxígeno. En las plantas participa en la síntesis de clorofila y es necesario en el cloroplasto para el mantenimiento de su función y estructura. El hierro también ejerce otras funciones como la respiración, la síntesis de ADN y la fijación de nitrógeno. Además de intervenir en procesos como la eliminación del peróxido de hidrógeno o la reducción de sulfato.<sup>[16]</sup>

Las plantas reciben el hierro del suelo, la mayor parte de este hierro está en forma de ion férrico (III) en suelos compuestos por minerales; el problema del ion férrico (III) es que es poco soluble en el rango de pH funcional de la planta en condiciones aeróbicas.<sup>[17]</sup>

La distribución natural de la vegetación se ve alterada por la biodisponibilidad del hierro, limitando el crecimiento de cultivos de gran interés económico; los niveles necesarios de hierro para un desarrollo óptimo de las plantas son cercanos a  $10^{-7}$  M. Mientras que, en suelos alcalinos y calcáreos, es decir, de elevado pH la concentración de Fe libre es de  $10^{-10}$  M aproximadamente, y se encuentra en forma de óxidos e hidróxidos de muy baja solubilidad. [16]

Una de las principales causas de la poca disponibilidad de Fe en el suelo para las plantas es la baja solubilidad y movilidad de este, por lo que el suelo puede contener hierro, pero no puede ser absorbido por la planta<sup>[18]</sup>; además un pH elevado, mucha humedad, alta salinidad, altas cantidades de arcillas, carbonatos y fosfatos provoca la deficiencia del hierro también. [16]

Otros factores que afectan al déficit de hierro en la planta son los relacionados con el metabolismo y la absorción de este, como es la variabilidad genética, la presencia de metales pesados o factores que inhiben el crecimiento natural de las raíces de la planta como la presencia de herbicidas, elevadas temperaturas o encharcamientos de los suelos de cultivo.

Debido al déficit de Fe aparecen en la planta diversos síntomas, como el amarillamiento intervenal de las hojas jóvenes, conocido como clorosis; y en casos extremos la hoja se torna blanca, manifestando necrosis. Este amarilleamiento de las hojas se produce por un cambio en la composición pigmentaria de los cloroplastos, orgánulos en los que se localiza aproximadamente el 80 % del Fe en la planta. El crecimiento de las hojas no se ve afectado por la falta de Fe, tan solo en casos extremos. Además, el rendimiento y la calidad de los cultivos se reduce gravemente ya que estas no son sus condiciones óptimas de crecimiento, causando una floración reducida y una fructificación menor y de frutos más pequeños. [16]



Figura 4: Comparativa de una planta que no absorbe los nutrientes primarios, secundarios y micronutrientes del suelo frente a una que sí lo hace<sup>[19]</sup>

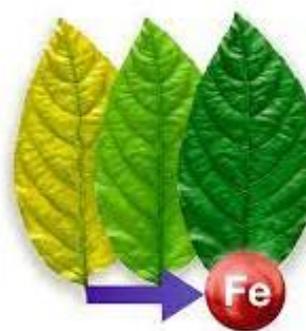


Figura 5: Síntoma déficit de Fe, de izquierda a derecha, amarilleamiento de las hojas<sup>[20]</sup>

Para superar la deficiencia de hierro las plantas han adaptado sus mecanismos de adquisición a las condiciones del medio. En las plantas eficientes, es decir, aquellas que desarrollan mecanismos de adaptación, se distinguen dos estrategias. [16]

### 1.3.1. Estrategia I

Adoptada por las plantas no gramíneas monocotiledóneas y dicotiledóneas, que son aquellas plantas cuyas semillas poseen una hoja embrionaria.<sup>[20]</sup>

La respuesta de estas plantas afecta a la estructura, fisiología y morfología de sus raíces; afecta a la fisiología ya que se produce un aumento de la capacidad de reducción de Fe(III) a Fe(II) de la raíz, mediante la actividad de la enzima reductasa de quelato férrica, unida a la membrana plasmática, con la ayuda de los electrones de NADPH citoplasmático; junto con un aumento en la evacuación de protones (H<sup>+</sup>) por las raíces hacia la rizosfera, zona del suelo cercana a las raíces y donde se desarrolla la vida microbiana, haciendo que se acidifique y por lo tanto facilitando la reducción de hierro presente en el suelo y de su posterior absorción; además, la acidificación de la rizosfera permite la excreción de compuestos fenólicos, flavinas y ácidos orgánicos, que actúan como agente quelante y reductor. En cuanto al cambio morfológico que produce esta respuesta en las plantas se da en el aumento de raíces laterales y pelos radiculares durante la expulsión de los protones desde el citoplasma hacia la rizosfera.<sup>[21]</sup>

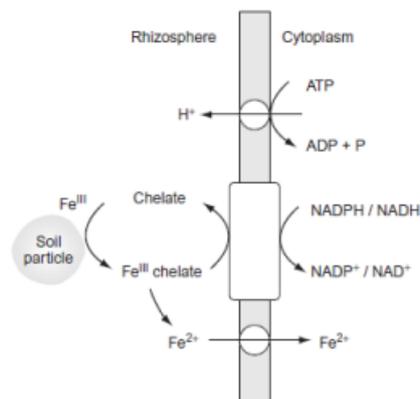


Figura 6: Estrategia I mecanismo de absorción de Fe<sup>[21]</sup>

### 1.3.2. Estrategia II

Adoptada por las raíces de las plantas gramíneas, como son el trigo o el maíz.

Estas plantas sintetizan y excretan aminoácidos no proteicos a la rizosfera, denominados fitosideróforos. Estos aminoácidos tienen acción quelante, solubilizando el Fe(III) que hay en el suelo y después es absorbido mediante receptores específicos presentes en la membrana plasmática de la raíz, sin haber sido reducido antes.<sup>[16]</sup>

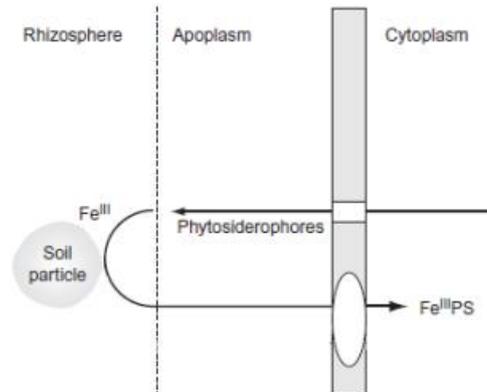


Figura 7: Estrategia II mecanismo de absorción de  $Fe^{2+}$

Tras la absorción del Fe por las raíces este se traslada a las partes con mayor demanda de hierro, se transporta por el xilema, uno de los dos tipos de vasos de las plantas, y es impulsado por la corriente de transpiración y la presión de la raíz hasta los brotes de la planta.<sup>[17]</sup>

Ante la falta de hierro las plantas dejan salir de ellas varios compuestos producidos durante el metabolismo, como son los carboxilatos, que se originan en el metabolismo primario; o los fenoles y flavinas que se originan durante el metabolismo secundario. La expulsión de compuestos fenólicos es una herramienta de las plantas para aumentar el Fe disponible en la rizosfera, ya que es ácido.<sup>[17]</sup>

La clorosis férrica a menudo no se produce porque el suelo no sea rico en hierro, sino porque este hierro se encuentra en una forma no asimilable para los cultivos por lo que se necesita del empleo de fertilizantes que aporten la concentración de hierro óptima para la planta, mediante el uso de fertilizantes quelados con hierro.

Los quelatos de hierro que se encuentran en los fertilizantes son compuestos orgánicos que contienen hierro, y pueden ser absorbidos por las raíces ya que son solubles en agua. Se trata de una molécula orgánica que envuelve y enlaza el ion metálico de tal manera que evita su precipitación, por lo que gracias a la acción quelante el hierro se mantiene en solución y la planta puede asimilarlo. Para que el quelato de hierro sea efectivo debe ser estable en ambientes de suelo, su estabilidad indica el grado de protección que el agente quelante ejerce sobre el hierro que contiene.<sup>[18]</sup>

La dosificación de este fertilizante debe repetirse con el tiempo ya que su eficacia se agota y la clorosis vuelve a aparecer, ya que este tipo de fertilizantes no resuelven el problema del suelo. Además, dependiendo del tipo de molécula quelante empleada la estabilidad varía, y su duración temporal depende de factores como el pH del suelo en el que se emplea o la cantidad de luz. Por lo que los quelatos sintéticos de hierro más eficaces son los constituidos a base de FeEDDHA (etilendiamino- di-o- hidroxifenilacetato ferrato (III)) y el FeEDDHMA

(etilendiamino- di-(o- hidroxil- p- metilfenilacetato) ferrato (III)), ya que ambos son estables frente a pH de entre 4 y 9 y presentan poca reactividad con los materiales minerales de pequeño tamaño. El problema del uso de estos fertilizantes son los riesgos ambientales, ya que son muy solubles, pudiendo solubilizar metales pesados que son lixiviados, y por su poca degradabilidad por los microorganismos del suelo.

Hay otro tipo de fertilizantes que aportan hierro basados en sales de hierro, por ejemplo, sulfato de hierro. Pero el hierro suministrado en forma de sal sufre una rápida insolubilización, por lo que no podría ser absorbido por las raíces. Por ello se recomiendan los quelatos de hierro cuya insolubilización es más lenta.<sup>[22]</sup>

#### 1.4. Fertilizantes orgánicos de hierro

Los fertilizantes orgánicos son productos de origen natural cuyos nutrientes se presentan en el material orgánico, de origen animal, vegetal u otro origen orgánico natural, en los que los principales nutrientes están químicamente enlazados o forman parte de otra serie de elementos químicos.

Su función principal es aportar nutrientes a las plantas, que deben proceder de materiales carbonados de origen animal o vegetal, para que estas crezcan en las mejores condiciones posibles. Además, cuentan con mayor eficacia ya que aportan nutrientes, pero también aportan materia orgánica a los suelos agrícolas favoreciendo su regeneración y aumentando la fertilidad, por lo que se tratan de fertilizantes mucho más sostenibles con el medio ambiente. Pero a pesar de esto no todos los fertilizantes orgánicos están relacionados con una agricultura ecológica.<sup>[23]</sup>

Los fertilizantes orgánicos al contener nutrientes de origen orgánico para poder ser asimilados por las plantas deben ser transformados en nutrientes minerales gracias a la acción de los microorganismos del suelo. Estos nutrientes se incorporan a las plantas de forma más lenta y gradual que si procediesen de fertilizantes sintéticos. Pero por lo que realmente interesa el empleo de fertilizantes orgánicos es por su capacidad de reponer la materia orgánica de los suelos, ya que esta disminuye por las extracciones de los cultivos y la mineralización.

Los niveles de materia orgánica son muy importantes en la agricultura, ya que esta forma complejos con los minerales de los suelos; estos complejos poseen la capacidad de retener nutrientes y dejarlos a disposición de las plantas, disminuyendo bloqueos y lixivitaciones, lo que favorece la asimilación de estos nutrientes minerales para los cultivos.<sup>[24]</sup>

Además, gracias a la materia orgánica se mejoran las características físicas del suelo agrícola, como es la capacidad de retención del agua, la porosidad o la permeabilidad del suelo; también se estimula la flora microbiana, que esta ayuda en transformar los compuestos disponibles en el suelo en nutrientes aptos para las plantas. Por lo que, un nivel de materia orgánica óptimo significa que los suelos son fértiles.<sup>[24]</sup>

El problema de los fertilizantes químicos es que se salinizan los suelos y esto conlleva un cansancio de estos disminuyendo las cosechas, por lo que los elevados rendimientos que se buscan empleando este tipo de fertilizantes se verían afectados; esto se debe a la elevada concentración de químicos empleados.<sup>[24]</sup>

Existen 3 tipos de fertilizantes orgánicos:<sup>[23]</sup>

- Compost:

Consiste en la descomposición controlada de distintos elementos sólidos de origen natural, el resultado es un fertilizante terroso que contiene toda clase de nutrientes que necesitan las plantas para su crecimiento. Para su formación intervienen distintos tipos de microorganismos, como bacterias, gusanos y hongos, sobre los residuos orgánicos sólidos que bajo las condiciones atmosféricas óptimas metabolizan el compuesto y lo convierten en materia natural apta para la fertilización, ya que posee sulfatos, nitrógeno, fósforo y carbono, entre otros, en su composición.<sup>[24]</sup>

- Humus:

Se trata del resultado de un proceso de compostaje sólido en que mediante lombrices detritívoras degradan elementos orgánicos, en su mayoría de origen vegetal, como son hojas, tallos o semillas, para dar como resultado un compuesto rico en minerales. Los elementos orgánicos que forman el humus son muy estables ya que se encuentran en un grado de descomposición muy elevado no pudiendo descomponerse más y por lo tanto no sufren transformaciones considerables. Este tipo de fertilizante contiene una elevada cantidad de carbono, por eso su color negro característico.<sup>[25]</sup>

- Purín:

Se trata de compuestos líquidos, resultado de procesos naturales de tipo animal, es decir, los excrementos de los animales de las explotaciones ganaderas y almacenados en estado líquido, orines y agua, en ambientes cerrados. O purín vegetal, resultado de la fermentación de plantas, con efectos incluso fungicidas o de activadores del suelo. Este tipo de fertilizante orgánico es rico en nitrógeno, fósforo, potasio y calcio.<sup>[26]</sup>

Existen también fertilizantes ricos en hierro, que aportan una gran cantidad de este a la planta, estos son:

- Lombricomposta:

Es el humus de lombriz, se compone de nitrógeno, fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc, manganeso y boro; por lo que aporta a los cultivos un alto contenido en nutrientes que mejoran los suelos agrícolas. Además, cabe destacar que su contenido en nutrientes primarios es bajo, pero aporta gran cantidad de micronutrientes.<sup>[27]</sup>

- Gallinaza:

Se trata del estiércol de las gallinas ponedoras, es decir, de sus excrementos mezclados con restos de comida, plumas y paja; tras un proceso de fermentación. Su aporte principal es el nitrógeno, nutriente primario, pero también es rico en fósforo, potasio, calcio, magnesio, hierro, cobre, zinc, manganeso y boro.<sup>[28]</sup>

El uso de fertilizantes orgánicos es una alternativa ecológica y eficiente con diversos beneficios, como es el aumento de la cantidad de nutrientes en el suelo debido a la liberación gradual y natural de los nutrientes; la producción de alimentos menos tóxicos, ya que son fertilizantes de origen natural y no producen residuos químicos; y, la mejora de la fertilización del suelo, permitiendo que el suelo se mantenga fértil más tiempo ya que estos fertilizantes regeneran naturalmente el suelo y lo nutren de toda clase de compuestos necesarios para su estabilidad. Derivando en que se tratan de un fertilizante más amigable con el medio ambiente, por ser 100 % de origen natural y no producir residuos químicos con efectos nocivos.<sup>[23]</sup>

## 1.5. Complejos de hierro con sustancias húmicas

La materia orgánica de los suelos es un factor esencial para la fertilidad de estos, la mayor parte de esta materia orgánica está constituida por un grupo de sustancias de tipo omnipresente, ya que se encuentran en suelos, aguas y sedimentos.<sup>[29]</sup> Estas se llaman sustancias húmicas, se tratan de la parte estable de la materia orgánica y son uno de los más importantes reservorios de carbono de la biosfera.<sup>[30]</sup>

Las sustancias húmicas se forman a partir de residuos de origen animal o vegetal mediante procesos bioquímicos, es decir, mediante microorganismos; su composición química es aproximadamente del 50 % de carbono, 35-45 % de oxígeno, 5 % de hidrógeno y un 3 % de nitrógeno y azufre. Contienen grupos aromáticos, como núcleo y grupos reactivos, como el hidroxilo o el carboxilo, además de puentes de unión y cadenas alifáticas.<sup>[30]</sup>

Son sustancias amorfas y coloreadas, por lo que, dependiendo de diversos factores, como su grado de condensación o contenido en carbono, su color varía; son polímeros

tridimensionales, por lo que tienen un elevado peso molecular; también tiene elevada resistencia a la degradación química o biológica ya que son de carácter ácido.<sup>[29]</sup>

Las sustancias húmicas se dividen en tres grupos:

- Ácidos húmicos:

Son sólidos amorfos cuya estructura está compuesta por grupos aromáticos y cadenas alifáticas. Además, de diversos grupos reactivos como hidroxilos o carboxilos. Son de color marrón oscuro y peso molecular muy alto.<sup>[31]</sup>

Se extraen en medio alcalino, por lo que son solubles a pH básico, pero insolubles en medio ácido y en agua, precipitando al acidificar.<sup>[29]</sup>

- Ácidos fúlvicos:

Son sólidos o semisólidos amorfos, con una estructura similar a los ácidos húmicos, pero de menor peso molecular, menos polimerizados y con una mayor cantidad de cadenas alifáticas y también mayor cantidad de grupos reactivos.<sup>[30]</sup>

Se extraen en medio alcalino, son solubles en agua en cualquier rango de pH.<sup>[29]</sup>

- Huminas:

Son sólidos, cuya estructura es similar a los ácidos húmicos, se diferencian en que sus grupos reactivos tienen menor aromaticidad, ya que tienen mayor contenido de polisacáridos alifáticos.<sup>[31]</sup>

No se pueden extraer mediante disoluciones alcalinas, fracción insoluble en agua a cualquier valor de pH.<sup>[29]</sup>

**Sustancias húmicas  
(polímeros pigmentados)**

Ácido fúlvico		Ácido húmico		Humina
Amarillo claro	Castaño claro	Castaño oscuro	Gris negruzco	Negro

Figura 8: Coloración de las sustancias húmicas (Stevenson 1982)

De las sustancias húmicas se conoce su composición química aproximadamente, pero sobre la estructura química de estas se tienen diversos estudios y modelos, pero pocos son capaces de describir correctamente la complejidad estructural de estas sustancias.<sup>[31]</sup>

A pesar de ello se tiene la capacidad de sintetizar sustancias húmicas y emplearlas en diversos usos; el aislamiento de estas consta de distintos pasos:

### 1.5.1. Extracción

Se trata del primer paso para aislar y caracterizar las sustancias húmicas, se deben extraer de tal forma que se alteren lo menos posible y además evitando extraer otro tipo de sustancias no húmicas, como pueden ser carbohidratos, grasas o aminoácidos, por lo que se trata de un paso muy crítico e importante. El compuesto empleado para separar las sustancias húmicas del resto de la mezcla debe poder solubilizarlas sin provocar cambios en su estructura molecular ni en sus propiedades.<sup>[31]</sup>

Para que este primer paso sea el idóneo se deben cumplir los siguientes objetivos:<sup>[31]</sup>

- El método empleado no debe alterar la materia orgánica aislada.
- Las sustancias húmicas extraídas no deben contener impurezas inorgánicas.
- Si el peso molecular medio de la fracción obtenida es representativo de la muestra la extracción se considera completa.
- El método empleado debe ser universal para cualquier sustrato o material.

Dependiendo del material/ sustrato se debe adoptar el método de extracción para así conseguir el máximo rendimiento durante la obtención.<sup>[31]</sup>

También hay una serie de factores que influyen en la extracción, estos son:

- Concentración y tipo de extractante:

Esto es el compuesto o sustancia empleado para separar las sustancias húmicas del resto, por lo que de este factor depende la solubilidad de la materia orgánica. El extractante debe ser alcalino, ya que es con lo que mejor rendimiento se obtiene; por ello, el más empleado era el NaOH, y luego el KOH.<sup>[30]</sup>

- Relación de extracción:

Relaciona el peso de sustrato con el volumen del agente extractante utilizado (P/ V), ya que influye en la concentración de la materia orgánica líquida que puede obtenerse en este primer paso. Es posible que se sature el extractante antes de que se realiza la extracción completa de la materia orgánica.<sup>[30]</sup>

- Tiempo de extracción:

Se considera que con 4 horas se solubiliza gran parte de la materia orgánica presente en suelos; pero este tiempo puede variar de 1 a 24 horas dependiendo del material.<sup>[30]</sup>

- Temperatura de extracción:

A mayor temperatura, independientemente del extractante utilizado o el sustrato, el rendimiento de extracción es mayor. <sup>[30]</sup>

### 1.5.2. Fraccionamiento

Consiste en la separación de los extractos de sustancias húmicas en sus componentes para así reducir su heterogeneidad y que sea más fácil la aplicación de distintas técnicas analíticas.

El método más empleado para este paso es la variación del pH, por las diferentes solubilidades de las sustancias, es decir, los ácidos húmicos, los ácidos fúlvicos y huminas. <sup>[31]</sup>

### 1.5.3. Purificación

La finalidad de este paso es la eliminación de otro tipo de sustancias que no sean de tipo húmicas, como pueden ser carbohidratos, proteínas, lípidos, etc., que son extraídas de forma errónea junto a las sustancias húmicas. <sup>[31]</sup>

El método más empleado se basa en dializar la muestra obtenida con agua desionizada. <sup>[30]</sup>

Una vez aisladas las sustancias húmicas se procede a su caracterización, que consiste en el estudio de la composición, estructura y proporciones de las fases individuales presentes en las sustancias. Estas están constituidas por una compleja mezcla de moléculas por lo que se suelen aplicar diversos métodos analíticos.

En cuanto al estudio de la composición, esta varía dependiendo del material de partida y del método de extracción utilizado. Mediante el análisis elemental se determina el carbono, el hidrógeno, el nitrógeno, el azufre y el oxígeno presente en la muestra, así como el análisis de los grupos funcionales; además de la acidez total.

Para el estudio del fraccionamiento depende de su tamaño molecular, pero algunas de las técnicas comúnmente utilizadas son la espectroscopia en el visible, ultravioleta e infrarrojo. También se pueden caracterizar mediante métodos degradativos, como degradaciones reductivas u oxidativas. <sup>[31]</sup>

Algunas fracciones de las sustancias húmicas interactúan sin problema con las raíces de los cultivos gracias a que se encuentran presentes en la solución del suelo, estas al ser solubles se consideran parte de la materia orgánica disuelta.

Otra parte de las sustancias húmicas tiene la capacidad de formar complejos estables con micronutrientes metálicos, gracias a que su estructura química se compone de grupos funcionales que contienen oxígeno, nitrógeno y azufre. Esto ayuda a que los micronutrientes se mantengan en solución o en formas biodisponibles a los valores de pH que se encuentran la mayoría de los suelos agrícolas, pudiendo así ser absorbidos por las raíces de las plantas.

Por lo que, las sustancias húmicas poseen un papel importante en la nutrición de hierro de las plantas debido a su capacidad para complejar metales y afectar a los mecanismos de la toma de nutrientes y a su metabolismo, ya que retrasan los procesos de cristalización del hierro. Esto se atribuye a su efecto quelante y bioestimulante. Se ha demostrado que las sustancias húmicas pueden proporcionar hierro disponible a la planta como resultado de la complejación de hierro por moléculas húmicas, con lo que las plantas pueden formar y utilizar directamente complejos de hierro- sustancias húmicas (Fe-SH) solubles para su nutrición. Estos complejos actuarían como quelatos naturales de hierro, interactuando con los mecanismos de absorción de la planta con un efecto directo sobre ella.

En el caso del hierro, los complejos de Fe-SH implican grupos que contienen oxígeno, como son los grupos carboxílicos y fenólicos; estos le proporcionan al complejo elevada estabilidad. Pero, la estabilidad de los complejos de Fe-SH es menos estable que la de los complejos formados por hierro y un agente quelante sintético (fertilizantes sintéticos). La estabilidad del complejo se ve afectada por el pH y por la relación molar entre el hierro y la sustancia húmica; con un pH entre 5 y 9 la estabilidad sería alta, pero tendría una baja relación Fe:SH; mientras que con pH más alcalino tendría una alta solubilidad y una baja relación Fe:SH. Concluyendo en que las plantas que crecen en suelos calcáreos, donde la biodisponibilidad del hierro es limitada podrían beneficiarse de la formación de complejos Fe-SH estables y, además solubles.

Las sustancias húmicas en suelos naturales, debido a su heterogeneidad y dispersión, también se pueden presentar como coprecipitados minerales, afectando a la biodisponibilidad del hierro, ya que estabilizan los óxidos de hierro amorfos gracias a las fracciones húmicas de elevado peso molecular. Las fases de Fe amorfas, coprecipitadas con sustancias húmicas insoluble, al mantenerse en esta forma representan un reservorio de hierro apto, mediante la movilización de ligandos, para la nutrición de las plantas con Fe.<sup>[32]</sup>

## 1.6. Alperujo como fuente de sustancias tipo húmicas

La actividad de la industria oleícola en España genera una elevada cantidad de residuos y subproductos con un impacto ambiental importante. Uno de los subproductos que se origina en las almazaras durante la extracción del aceite de oliva es el alperujo. Este se trata de la mezcla de aguas de vegetación y partes sólidas de la aceituna, como es el hueso, la piel, el mesocarpio, y restos grasos; por lo que tiene una elevada humedad y abundancia de sólidos finos y compuestos. Esto dificulta los posibles procesos de extracción química para aprovechar el aceite que queda en este subproducto, por lo que se buscan diversas alternativas para su aprovechamiento, como puede ser la combustión completa del alperujo

para generar energía eléctrica; u otras vías alternativas que se basan en ensayos para probar su uso en alimentación de animales o en la aplicación directa en el suelo.<sup>[31]</sup>

El alperujo se caracteriza por su consistencia semisólida, debido a su elevado contenido de humedad, de materia orgánica y de micronutrientes; además, de altos contenidos de ácidos grasos y de sustancias fenólicas. La utilización de este proporciona efectos positivos en los cultivos agrícolas, pero su uso directo en los suelos no es recomendable ya que puede causar la inhibición del crecimiento de las plantas o de la germinación de semillas, como también, desestabilizar la estructura y actividad microbiana de los suelos agrícolas. Por lo que una de las alternativas estudiadas para la valorización de este residuo consiste en el compostaje, como una forma fácil y económica de transformar desechos orgánicos en materiales de calidad mediante la extracción de un producto estable que pueda ser utilizado como enmienda orgánica.<sup>[33]</sup>

Una enmienda orgánica es aquel producto procedente de materiales carbonados de origen animal o vegetal y cuya función es mantener o mejorar el contenido de materia orgánica del suelo, las sustancias húmicas son un tipo de enmienda, ya que mejoran las propiedades físicas, biológicas y la actividad química de los suelos.<sup>[24]</sup>

Tradicionalmente se empleaba el suelo como sustrato para el aislamiento y caracterización de sustancias húmicas; sin embargo, existe una gran cantidad de materiales que también pueden ser utilizados como materia prima para someterse a la extracción y caracterización de las sustancias húmicas.

El compost de alperujo se muestra como una buena alternativa para la obtención de sustancias húmicas debido a su alto contenido en materia orgánica por la naturaleza lignocelulósica del alperujo, constituyendo las bases de sus propiedades húmicas.<sup>[31]</sup>

La obtención de sustancias húmicas a partir del alperujo se basa en procesos de extracción, separación y purificación. La extracción se hace mediante reactivos alcalinos con diferentes tiempos de reposo o agitación; el extractante químico empleado más comúnmente es el hidróxido de sodio, pero este en el caso del alperujo produce alteraciones en las propiedades físico- químicas y en la estructura de las sustancias húmicas, además, de extraer también sustancias de tipo no húmicas. Por lo que el extractante empleado es el hidróxido de potasio (KOH), este da resultados más ventajosos, ya que el potasio no influye negativamente en la fisiología de las plantas. Con lo que se obtiene de manera eficiente un producto no alterado y caracterizado por ser de bajo peso molecular; cuyo efecto en la formación de complejos con micronutrientes, así como su difusión en el suelo y su absorción por las plantas han quedado demostrados en diferentes investigaciones. Estas sustancias tienen mayor movilidad en el suelo en comparación con moléculas de elevado peso molecular, y es factible su aplicación en sistemas de producción sostenibles o ecológicos.<sup>[33]</sup>

Por ello, en este TFG se pretende extraer y caracterizar las sustancias tipo húmicas del alperujo para así investigar y estudiar si es posible el uso del alperujo como fuente de húmicos y su posterior uso en agricultura sostenible como aporte del hierro necesario para los cultivos mediante fertilizantes.

## 2. Objetivos

El objetivo de este trabajo fin de grado es la búsqueda de una economía circular mediante la revalorización de residuos vegetales de origen agroalimentario, más concretamente del alperujo proveniente de las almazaras, para su uso como fuente de húmicos complejantes de hierro. Y posterior empleo como fertilizantes como contribución a la transformación de la industria agroalimentaria hacia un escenario más verde, sostenible y saludable, tanto para el medio ambiente como para los humanos.

Por lo que se procede a la extracción y caracterización de sustancias complejantes del hierro con los objetivos específicos de:

- Optimizar el proceso de extracción, estudiando cómo afecta la variación del pH a esta, experimentando con tres pH distintos de extracción.
- Caracterizar las sustancias húmicas extraídas mediante métodos espectroscópicos, fluorescencia y espectrofotometría; determinación de radio hidrodinámico de las partículas (DLS); del carbono orgánico total (TOC), y de la demanda química de oxígeno (DQO).
- Formación de complejos Fe-SH con el empleo de sales de hierro inorgánicas,  $\text{FeCl}_3$  hexahidratado.
- Determinación del contenido de hierro complejado y análisis de la estabilidad de los distintos complejos a valores de pH variables, mediante el análisis con orto-fenantrolina.
- Estudio de la posible eficacia de estos complejos como fertilizantes, mediante ensayos de germinación.

En cuanto a los objetivos de desarrollo sostenible (ODS), establecidos por las Naciones Unidas, este proyecto abarca varios de ellos, son:

- Objetivo 9: Industria, innovación e infraestructura. Ya que se trata de un proyecto que promueve la investigación e innovación científica, con el objetivo de hallar avances para los desafíos económicos y ambientales.
- Objetivo 12: Producción y consumo responsable. En este proyecto se desea reutilizar desechos de una gran industria contribuyendo así a la reducción de la huella de carbono, mediante cambios en la gestión de eliminación de desechos tóxicos y contaminantes.
- Objetivo 13: Acción por el cambio climático. Ya que contribuye a la lucha contra el cambio climático.

- Objetivo 15: Vida de ecosistemas terrestres. Ya que este proyecto desea utilizar los residuos de una almazara como fertilizantes, por lo que contribuye al sustento de la agricultura.

## 3. Parte experimental

Para la realización de este trabajo se han utilizado distintos reactivos, materiales, equipos y técnicas analíticas especificados a continuación.

### 3.1. Reactivos

Los reactivos empleados durante este proyecto se enumeran a continuación.

#### 3.1.1. Alperujo

El alperujo es uno de los residuos o subproductos de una almazara originado durante la extracción de aceite de oliva. Se trata de la mezcla de las partes sólidas de la oliva, como es la piel, el mesocarpio y el hueso, con aguas de vegetación y restos grasos.<sup>[34]</sup>

El alperujo empleado en este proyecto proviene de una almazara de Aspe, municipio del interior de la provincia de Alicante, Comunidad Valenciana. La muestra se recogió en enero de 2023 y fue almacenada en nevera, para una mejor conservación.

#### 3.1.2. Hidróxido de potasio

El hidróxido de potasio al 85 % EPR se utiliza como medio alcalino para alcanzar un pH básico. Sus características se muestran en la *Tabla 1*.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	1310- 58- 3
<b>Fórmula</b>	KOH
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	56.11
<b>Pureza (%)</b>	85
<b>Presentación</b>	Lentejas

*Tabla 1: Características KOH*

#### 3.1.3. Agua destilada

El agua destilada es un agua purificada y sin ningún tipo de impurezas, por lo que no contiene microorganismos ya que ha sido sometida a un proceso de destilación. Es el agua empleada en el laboratorio para la mayoría de las reacciones.<sup>[35]</sup>

En el laboratorio el sistema utilizado es el purificador de agua Millipore que se encuentra en el propio laboratorio y que cuenta con un depósito de polietileno para almacenar el agua de forma segura evitando su contaminación.

### 3.1.4. Hidróxido sódico

Se emplea para el ajuste del pH; en el laboratorio se encuentra en disoluciones ya hechas de 1 M y 0.1 M para dependiendo de si al pH que se quiere ajustar está más cercano o menos. Para conocer la cantidad de NaOH que necesitan las disoluciones ya disponibles, en el laboratorio se realizan los siguientes cálculos:

- Para una disolución 1 M en un volumen de 250 mL se necesitan 10 g de NaOH.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M \cdot V = n \rightarrow 1M \cdot 0.250L = 0.250 \text{ mol NaOH} \quad (\text{Ec. 1})$$

$$m = n \cdot M_r \rightarrow m = 0.250 \text{ mol NaOH} \cdot 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \rightarrow m = 10 \text{ g de NaOH} \quad (\text{Ec. 2})$$

- Para una disolución 0.1 M en un volumen de 250 mL se necesita 1 g de NaOH.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M \cdot V = n \rightarrow 0.1M \cdot 0.250L = 0.0250 \text{ mol NaOH} \quad (\text{Ec. 3})$$

$$m = n \cdot M_r \rightarrow m = 0.0250 \text{ mol NaOH} \cdot 40 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \rightarrow m = 1 \text{ g de NaOH} \quad (\text{Ec. 4})$$

Las características del NaOH empleado se muestran en la *Tabla 2*.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	1310- 73- 2
<b>Fórmula</b>	NaOH
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	40.00
<b>Pureza (%)</b>	97
<b>Presentación</b>	Lentejas

*Tabla 2: Características NaOH*

### 3.1.5. Ácido sulfúrico

El ácido sulfúrico se emplea para el ajuste del pH, al ser un ácido se utiliza para disminuir el valor del pH. En el laboratorio se encuentran las disoluciones de 1 M y 0.1 M ya hechas, donde para 250 mL a una concentración de 1 M se necesitan 13.33 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M \cdot V = n \rightarrow 1M \cdot 0.250L = 0.250 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 5})$$

$$m = n \cdot M_r \rightarrow m = 0.250 \text{ mol NaOH} \cdot 98.08 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \rightarrow$$

$$m = 24.52 \text{ g de H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 6})$$

$$\rho = \frac{m}{V_{ml}} \rightarrow V_{ml} = \frac{m}{\rho} \rightarrow V_{ml} = \frac{24.52 \text{ g}}{1.84 \frac{\text{kg}}{\text{L}}} \rightarrow V_{ml} = 13.33 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 7})$$

Y para una disolución a 0.1 M en 250 mL, 1.33 mL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M \cdot V = n \rightarrow 0.1 \text{ M} \cdot 0.250 \text{ L} = 0.0250 \text{ mol H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 8})$$

$$m = n \cdot M_r \rightarrow m = 0.0250 \text{ mol NaOH} \cdot 98.08 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \rightarrow$$

$$m = 2.452 \text{ g de H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 9})$$

$$\rho = \frac{m}{V_{ml}} \rightarrow V_{ml} = \frac{m}{\rho} \rightarrow V_{ml} = \frac{2.452 \text{ g}}{1.84 \frac{\text{kg}}{\text{L}}} \rightarrow V_{ml} = 1.33 \text{ mL H}_2\text{SO}_4 \quad (\text{Ec. 10})$$

Las características del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> se muestran en la *Tabla 3*.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	7664- 93- 9
<b>Fórmula</b>	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	98.08
<b>Densidad (kg/L)</b>	1.84
<b>Pureza (%)</b>	96
<b>Presentación</b>	Líquido

*Tabla 3: Características H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*

### 3.1.6. Cloruro férrico hexahidratado

El cloruro férrico hexahidratado se emplea para determinar la capacidad complejante de las muestras del proyecto.

<b>Proveedor</b>	Scharlau
<b>Nº CAS</b>	10025- 77- 1
<b>Fórmula</b>	FeCl <sub>3</sub> · 6H <sub>2</sub> O
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	270.32
<b>Pureza (%)</b>	EPR (extra pure)
<b>Presentación</b>	Sólido

*Tabla 4: Características FeCl<sub>3</sub>*

### 3.1.7. Tampón acético

El tampón acético (HAc/ Ac<sup>-</sup>) se emplea para la determinación del hierro mediante el método de la ortofenantrolina. Para 1 L de tampón acético se utilizan 250 g/ L de acetato de amonio y 750 mL/L de ácido acético. Sus propiedades están en la *Tabla 5* y *Tabla 6*, respectivamente.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	631- 61- 8
<b>Fórmula</b>	CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	77.08
<b>Pureza (%)</b>	98
<b>Presentación</b>	Sólido

*Tabla 5: Características CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>*

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	64- 19- 7
<b>Fórmula</b>	CH <sub>3</sub> COOH
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	60.05
<b>Densidad (kg/L)</b>	1.052
<b>Pureza (%)</b>	99.7
<b>Presentación</b>	Líquido

*Tabla 6: Características CH<sub>3</sub>COOH*

### 3.1.8. O- Fenantrolina

La orto-fenantrolina se emplea en la determinación de hierro mediante el método de la orto-fenantrolina; en el laboratorio se prepara 1 L de disolución a partir de 1 g de reactivo con agua destilada dejándolo en agitación hasta que sea homogénea la disolución, si se le aplica calor este proceso se da de forma más rápida.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	5144- 89- 8
<b>Fórmula</b>	C <sub>12</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> · H <sub>2</sub> O
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	198.23
<b>Pureza (%)</b>	99.7
<b>Presentación</b>	Sólido

*Tabla 7: Características o-fenantrolina*

### 3.1.9. Ácido ascórbico

El ácido ascórbico C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub> se utiliza para la determinación de hierro por el método de la orto-fenantrolina. Sus características se muestran en la *Tabla 8*.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	50- 81- 7
<b>Fórmula</b>	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>6</sub>
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	176.13
<b>Pureza (%)</b>	99.0
<b>Presentación</b>	Sólido

*Tabla 8: Características C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>6</sub>*

### 3.1.10. Sodio cloruro

El NaCl se utiliza para hacer una disolución salina, simulando el agua de mar y poder realizar un control salino.

<b>Proveedor</b>	PanReac AppliChem
<b>Nº CAS</b>	7647- 14- 5
<b>Fórmula</b>	NaCl
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	58.44
<b>Pureza (%)</b>	99.5
<b>Presentación</b>	Sólido

Tabla 9: Características NaCl

### 3.1.11. Ácido nítrico

El HNO<sub>3</sub> se emplea para el ajuste del pH, al ser un ácido se utiliza para disminuir el valor del pH. El ácido utilizado está al 65 %, sus cálculos se especifican de la ecuación (Ec. 11) a la (Ec. 14) y sus características en la **Tabla 10**.

Para una disolución con una concentración 1 M en 25 mL es necesario 1.74 mL de HNO<sub>3</sub>.

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow M \cdot V = n \rightarrow 1M \cdot 0.0250L = 0.0250 \text{ mol HNO}_3 \quad (\text{Ec. 11})$$

$$m = n \cdot M_r \rightarrow m = 0.0250 \text{ mol HNO}_3 \cdot 63.01 \frac{\text{g}}{\text{mol}} \rightarrow m = 1.58 \text{ g de HNO}_3 \quad (\text{Ec. 12})$$

$$\rho = \frac{m}{V_{ml}} \rightarrow V_{ml} = \frac{m}{\rho} \rightarrow V_{ml} = \frac{1.58\text{g}}{1.395 \frac{\text{kg}}{\text{L}}} \rightarrow V_{ml} = 1.13 \text{ mL HNO}_3 \quad (\text{Ec. 13})$$

Pero al no ser puro, sino encontrarse al 65 % de pureza:

$$V_{ml65\%} = \frac{V_{ml}}{\text{Pureza}} \rightarrow V_{ml65\%} = \frac{1.13 \text{ mL puro}}{0.65} \rightarrow V_{ml65\%} = 1.74 \text{ mL HNO}_3 \quad (\text{Ec. 14})$$

<b>Proveedor</b>	Labkem
<b>Nº CAS</b>	7697- 37- 2
<b>Fórmula</b>	HNO <sub>3</sub>
<b>Peso molecular (g/ mol)</b>	63.01
<b>Densidad (kg/L)</b>	1.395
<b>Pureza (%)</b>	65
<b>Presentación</b>	Líquido

Tabla 10: Características HNO<sub>3</sub>

### 3.1.12. Bioestimulante comercial

El bioestimulante agrícola se utiliza con el objetivo de ayudar a los cultivos a mejorar y regular sus procesos bioquímicos y fisiológicos. Su composición es la mezcla de diferentes compuestos químicos o naturales que ayuden a las plantas, el bioestimulante comercial utilizado en este proyecto deriva de los residuos de la caña de azúcar, está compuesto por sustancias húmicas y un 4 % de potasio. Está al 40 % de pureza.

### 3.1.13. Semillas

Las semillas que se cultivan en este proyecto provienen de Ramiro Arnedo s.a., productor autorizado con el nº 23. La especie es el tomate (*Solanum lycopersicum*) de la variedad marmande, las semillas no han sido tratadas y cumplen las reglas y normas CE. El paquete de las semillas es distribuido a laboratorios por Akralab bajo el número de referencia 200101210501, contiene 1000 semillas con un peso en seco de 2.8 g.

## 3.2. Materiales

Los materiales de laboratorio utilizados se describen a continuación:

#### Materiales de vidrio:

- Vaso de precipitado
- Matraz Erlenmeyer
- Matraz aforado
- Matraz Büchner
- Probeta
- Vidrio de reloj
- Viales

#### Otros materiales:

- Embudo Büchner
- Jeringuilla desechable
- Agitador magnético
- Cuentagotas
- Papel de filtro
- Espátulas
- Parafilm
- Gomas embudo
- Pie de rey
- Regla

### 3.2.1. Balanza digital

La balanza sirve para pesar o medir la masa de una sustancia o cuerpo con una elevada precisión en las medidas tomadas. Y dependiendo del modelo su capacidad y precisión dependen.

Se emplea la balanza analítica, mostrada en la **Figura 9**, para pesar muestras de menor tamaño; está es una Sartorius hecha en Alemania con una pesaje máximo de 200 g y una legibilidad de 0.1 mg.

Sin embargo, para muestras de mayor tamaño en las que no se necesite de tan elevada precisión se emplea la balanza de precisión mostrada en la **Figura 10**, esta es una de marca

Cobos modelo C- 300- SX con un pesaje máximo de 300 g, una precisión de 0.01 g y un pesaje mínimo de 0.5 g.



Figura 9: Balanza analítica



Figura 10: Balanza de precisión

### 3.2.2. Filtro fibra de vidrio

Estos filtros se utilizan para el análisis de contaminantes, la clarificación de líquidos y la recolección de sólidos suspendidos, por lo que son usados en ensayos de gravimetría o analíticos. Están hechos de borosilicato y los empleados para la extracción en este proyecto son los de la marca Frisenette modelo GC  $\varnothing$  90 mm sin aglutinante, con un tamaño de poro de 1.2  $\mu$ m y un diámetro de filtro de 90 mm; en la caja van 100 unidades.



Figura 11: Filtros fibra de vidrio

### 3.2.3. Filtro poliamida

Se utilizan filtros de poliamida para la eliminación de las impurezas, como pueden ser sólidos en suspensión u otros contaminantes que no se han eliminado, para así obtener muestras correctas y poder analizarlas correctamente. Dependiendo del contaminante el filtro

empleado varía, ya que si no es el adecuado el contaminante puede quedar atrapado en el propio filtro.

Los filtros empleados en este ensayo son de poliamida, ya que este material permite que los componentes polares pasen a través del filtro. Estos son fabricados por la empresa Macherey-Nagel en Alemania y son distribuidos por Akralab; tienen un tamaño de poro de  $0.45\ \mu\text{m}$  y su diámetro es de 25 mm.<sup>[36]</sup>

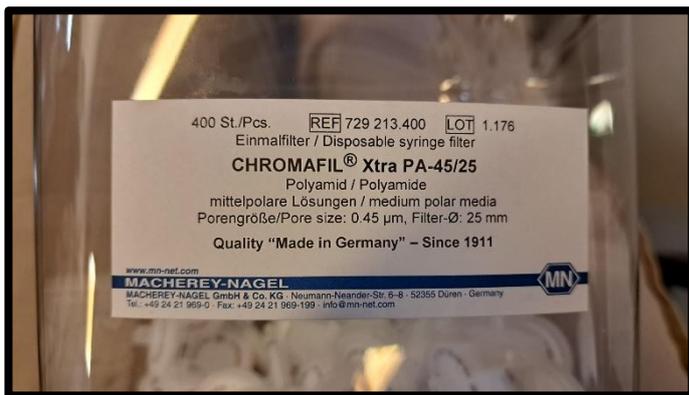


Figura 12: Etiquetado filtros poliamida



Figura 13: Filtros poliamida

Estos filtros se utilizan colocándolos al final de una jeringuilla desechable; el procedimiento es primero absorber el contaminante con la jeringuilla y después colocar el filtro para paulatinamente filtrar el contenido de la jeringuilla en otro recipiente.

### 3.2.4. Cubetas de cuarzo

Las cubetas de cuarzo se utilizan para mediciones espectroscópicas y de fluorescencia dentro de rango UV y visible de 200 a 2500 nm, ya que ofrecen mediciones muy precisas.

Las usadas en el laboratorio son de cuarzo para espectrofotómetro con paso de luz de 10 mm y están compuestas por dos materiales, vidrio óptico para el espectro visible (340- 2500 nm) y cuarzo sintético para el ultravioleta (190- 2500 nm). Disponen de un tapón de cierre no hermético y el volumen que puede contener es de 3.50 mL.<sup>[36]</sup>



Figura 14: Caja cubetas de cuarzo



Figura 15: Cubetas de cuarzo

### 3.2.5. Micropipetas

La micropipeta se utiliza para medir pequeños volúmenes de líquido con precisión. En el laboratorio las empleadas son la de volumen variable 100- 1000  $\mu\text{m}$  con una imprecisión de entre el 0.2- 0.7 %. Y para volúmenes de mayor tamaño las de volumen variable 0.5- 5 mL con una imprecisión de 0.2- 0.6 %.

### 3.2.6. Filtro cuantitativo

El papel de filtro se utiliza para el análisis cuantitativo de diversos estudios, como la contaminación del aire o de un líquido contaminante debido a su tamaño de poro. Pero en este proyecto se emplea para el fondo de la placa Petri, donde se coloca con el fin de crear una capa que absorba la disolución empleada para alimentar a los microorganismos y así que estos se pueden nutrir del filtro.

Los utilizados han sido la marca Frisenette modelo Papel de filtro cuantitativo Grado 441, con un tamaño de poro de 12 a 15  $\mu\text{m}$ , un diámetro de filtro de 90 mm y un contenido en ceniza del 0.007 %; en la caja van 100 unidades. [36]



Figura 16: Caja filtros cuantitativos



Figura 17: Filtro cuantitativo dentro de Placa Petri

### 3.2.7. Placas Petri

Las placas de este tipo se utilizan en microbiología para el cultivo de microorganismos; en estas placas se prepara un medio de cultivo que sea propicio para el crecimiento y reproducción de los microorganismos, como pueden ser hongos o bacterias; además para optimizar el crecimiento se deben incubar a una temperatura y tiempo óptimo dependiendo del microorganismo.

Las placas Petri usadas son del fabricante FL Medical, hechas de poliestireno por lo que son extremadamente transparentes, han sido fabricadas en un ambiente estéril. Su diámetro es de 90 mm y el producto viene en embalajes de 20 unidades.



Figura 18: Placa Petri<sup>[37]</sup>

### 3.2.8. Agitador mecánico rotativo

El agitador es utilizado para mezclar o juntar distintas sustancias gracias a la agitación, al ser mecánico significa que funciona gracias a una máquina que al activarse no necesita de la persona para su funcionamiento; rotativo es por el tipo de movimiento que hace durante la agitación, en este caso giros.

El agitador del que se dispone en el laboratorio es de la empresa SAI, el modelo es Agitaser y es el mostrado en la **Figura 19**.



Figura 19: Agitador mecánico rotativo

### 3.3. Equipos

Los equipos utilizados en la realización de este proyecto se especifican a continuación.

#### 3.3.1. Estufa

La estufa de secado se emplea para mantener las muestras a una temperatura y humedad idóneas, para el secado de muestras, la deshidratación de estas o el calentamiento de muestras.

La estufa utilizada en el laboratorio es del fabricante Binder, cuenta con convección natural o forzada.

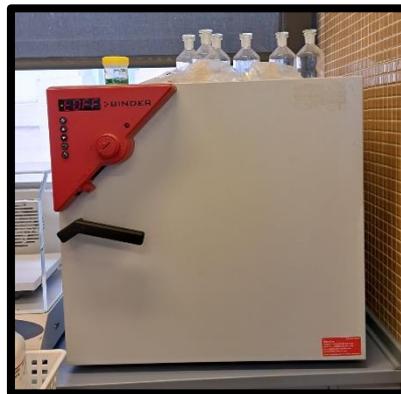


Figura 20: Estufa

#### 3.3.2. pH-metro

Para conocer el grado de acidez o basicidad de una solución se emplea el pH-metro, este mide la actividad del ion hidrógeno en soluciones acuosas mediante la diferencia de potencial eléctrico entre un electrodo de pH y un electrodo de referencia.<sup>[38]</sup>

En el laboratorio el pH-metro que se usa es del fabricante Mettler Toledo que cuenta con un soporte para calibración.



Figura 21: pH-metro

### 3.3.3. Bomba de vacío

La bomba de vacío en este caso se utiliza para el filtrado, consiguiendo acelerar la filtración debido a su capacidad de aspiración que aumenta la presión.

Esta bomba es del fabricante Welch en Luisiana, Estados Unidos, se trata de una bomba de vacío con pistón de uso general, modelo 2546C- 02; tiene una tensión de 230 V, una frecuencia de 50 Hz y un caudal de 1.6 L/ min.<sup>[39]</sup>



Figura 22: Bomba de vacío



Figura 23: Motor bomba de vacío

### 3.3.4. Carbono orgánico total (TOC)

Técnica empleada para cuantificar la cantidad de materia orgánica presente en las muestras líquidas o sólidas.

Para la medición se ha empleado un equipo de la marca Shimadzu modelo TOC- VCSH. Al combinarlo con el muestreador automático modelo ASI- V se realiza la medición de muestras en estado líquido. Esta consiste en la oxidación catalítica por combustión a 680°C para medir de manera precisa cualquier tipo de sustancia orgánica ya que oxida incluso compuestos orgánicos persistentes o insolubles. Su medición es muy precisa ya que no se ve afectada por

sustancias que puedan interferir o por las propias propiedades de la muestra como el pH o la conductividad.



Figura 24: TOC líquido

Para medir muestras en estado sólido se combina el TOC- VCSH con el muestreador modelo SSM- 5000A que consiste en una combustión a alta temperatura, 900°C, sin catalizador para muestras máximo de 1 g de masa, pero se recomienda que la muestra sea de menor tamaño para reducir los errores debidos a la distribución desigual del contenido de carbono en la muestra.<sup>[40]</sup>



Figura 25: TOC sólido

### 3.3.5. Dispersión de luz dinámica (DLS)

La dispersión de luz dinámica es una técnica utilizada para medir las características físicas de las partículas en solución de muy pequeño tamaño, por debajo del micrón, en el intervalo de 10 a 100 nm. Es una técnica no invasiva que mide el tamaño y la distribución de las partículas y moléculas de una muestra.

Consiste en un haz de luz láser que atraviesa la solución de la muestra y monitoriza los fotones dispersos, midiendo las fluctuaciones reales de las partículas gracias al movimiento Browniano de las partículas o moléculas que están en suspensión; por lo que el haz de luz se dispersa en diferentes intensidades y mediante el análisis de estas fluctuaciones de intensidad se calcula la velocidad del movimiento Browniano y mediante la relación Stokes- Einstein el tamaño de partícula de la muestra, por lo tanto, el valor de radio hidrodinámico, la anchura de la partícula y el grado de dispersión que indica la homogeneidad de la muestra.

El DLS empleado en el laboratorio es del fabricante Malvern Panalytical, es el equipo Zetasizer Nano series ZS.<sup>[41]</sup>



Figura 26: DLS

### 3.3.6. Espectrofluorómetro

La espectrometría de fluorescencia mide la fluorescencia de una muestra mediante espectroscopía electromagnética, esto es gracias a la capacidad de algunas moléculas de absorber la energía con una cierta longitud de onda y después emitirla con una longitud de onda más larga. Consiste en la emisión de luz ultravioleta, mediante una lámpara fluorescente, que incide en la muestra y la excita, la señal que causa, es decir, la emisión menos energética, es recogida por los detectores del equipo. En el laboratorio el equipo

utilizado es de la marca Cibion, modelo PTI QuantaMaster 40, espectrofluorímetro de estado estacionario con una elevada sensibilidad.<sup>[42]</sup>



Figura 27: Fluorímetro

### 3.3.7. Espectrofotómetro

El espectrofotómetro mide la cantidad de intensidad de luz absorbida por una muestra a partir de la luz que refleja o transmite esta cuando el haz de luz monocromática incide en ella. El espectrofotómetro se emplea por tanto para conocer la naturaleza de la muestra y para saber que cantidad de una sustancia presente en la muestra hay en ella.<sup>[43]</sup>

El equipo empleado es el modelo UH5300 del fabricante Hitachi, sus características son de espectrofotometría en el UV y visible y con una velocidad de barrido máxima de 100 nm/min.<sup>[44]</sup>

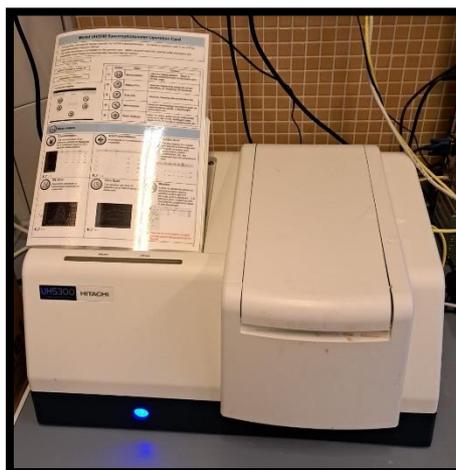


Figura 28: Espectrofotómetro

### 3.3.8. Demanda química de oxígeno (DQO)

La DQO sirve para determinar la cantidad de oxígeno que se requiere para oxidar la materia orgánica ya sea disuelta o en suspensión de una muestra en estado líquido con una

temperatura, un tiempo y un agente oxidante específico. Se utiliza para medir el grado de contaminación de la muestra y se expresa en  $\text{mg O}_2/\text{L}$ .<sup>[45]</sup>

El termorreactor y fotómetro utilizado para determinación de la DQO son los mostrados en la **Figura 29**, donde se puede ver a la izquierda de la imagen el termorreactor y a la derecha de este el fotómetro. Ambos equipos son de la marca Spectroquant; el termorreactor de la serie TR, modelo 620; y el fotómetro, modelo Nova 60 A.



*Figura 29: Termorreactor y espectrofotómetro para la medida de la DQO*

### 3.3.9. Incubadora

La incubadora se utiliza para mantener la temperatura, la humedad y otras condiciones, como el alcance de luz, en condiciones óptimas para que los cultivos microbiológicos crezcan y se reproduzcan.

La incubadora del laboratorio es del distribuidor Trade Raypa, cuenta en su parte inferior con una ruleta para variar la temperatura y un indicador de temperatura con aguja.



*Figura 30: Incubadora*

### 3.3.10. Caja de luz

La caja de luz se trata de una caja con una superficie que emite luz desde su interior; gracias a esta luz los objetos que se coloquen en la superficie se podrán observar de una forma más clara y precisa. La caja de luz utilizada es de la marca Color- Control.



Figura 31: Caja de luz

### 3.3.11. Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

Este equipo se encuentra disponible en la Universidad de Alicante (UA) dentro de sus servicios técnicos de investigación. La DSC es una técnica cuantitativa que permite obtener información de la temperatura a la cual tiene lugar el cambio energético en estudio y del calor involucrado en el proceso; puede ser dos tipos, de flujo de calor o de potencia compensada.

En la UA se cuenta con un amplio equipo de DSC de flujo de calor con modulación de temperatura de la marca TA Instruments.<sup>[46]</sup>

### 3.3.12. Análisis elemental

El equipo que realiza este tipo de análisis se encuentra disponible en la Universidad de Alicante (UA), que cuenta con una amplio rango de equipamiento para este tipo de análisis, que consiste en una completa e instantánea oxidación de la muestra mediante una combustión con oxígeno puro a una temperatura aproximada de 1000°C proporcionando el valor del contenido total de carbono, hidrógeno, nitrógeno y azufre presente en la dicha muestra.<sup>[47]</sup>

## 3.4. Procedimiento experimental

Los pasos a seguir para la extracción y la posterior caracterización del residuo se detallan a continuación.

### 3.4.1. Humedad muestras

Se deben preparar 4 muestras, para ello se pesan 4 vidrios de reloj vacíos y se marcan para poder diferenciarlos. En cada vidrio pesar aproximadamente 10 g de residuo, es decir, del alperujo.

Calentar las estufas una a 50°C y, otra, a 105°C; una vez calientes introducir dos muestras en la de una temperatura y las otras dos muestras en la otra. Se deben dejar 24 horas en su interior.

Pasado este tiempo, extraer las muestras y volver a pesar. La diferencia de masa entre la muestra inicial y la final indicará la cantidad de agua que se ha evaporado gracias al calor, pudiendo calcular la humedad presente en cada muestra; estos cálculos están representados en la **Tabla 12**.

### 3.4.2. Preparación extracciones

Para la extracción de las sustancias húmicas del residuo de las almazaras se debe realizar una digestión con un reactivo alcalino, en este caso, el hidróxido de potasio (KOH) para así separar las huminas de los ácidos húmicos y fúlvicos, ya que las huminas son insolubles mientras que los otros dos son solubles en medio alcalino.

Se van a realizar tres extracciones a pH diferentes, estos serán pH 13, pH 11 y pH 9. Siendo el procedimiento experimental el mismo para las tres muestras, lo único que cambia es la cantidad de KOH que se debe emplear para alcanzar los tres pH deseados, pero esta alteración se aclara en cada una de las extracciones.

La primera extracción realizada es a pH 13, se emplean 0.125 kg de alperujo para 0.5 L de agua destilada, en una relación 1:5. En un matraz aforado de 0.5 L enrasar con agua destilada, después verter en un vaso de precipitado y medir el pH; importante asegurarse de que el pHmetro este calibrado y limpio su electrodo, el pH del agua destilada es de 5.8 aproximadamente y el objetivo es una solución con un pH 13 por lo que se le añade KOH, para así aumentar la alcalinidad de la solución. La cantidad de KOH que se debe añadir es de 3.3 g, este cálculo se muestra en la **Ecuación 3**, la incorporación del KOH se realiza con agitación magnética para que este se disuelva evitando que quede una distribución no uniforme. Si el valor de pH deseado no se alcanza se puede añadir más KOH ya que la cantidad añadida es aproximativa para la subida del pH, en caso de excederse del valor deseado se añadiría agua destilada a la solución, y después se enrasaría nuevamente para asegurarse que el volumen es el correcto.

Una vez alcanzado el valor de pH 13 llevar la solución a un matraz Erlenmeyer y agregar los 0.125 kg de alperujo pesados previamente, dejar en agitación con la boca del matraz tapa por el Parafilm, para evitar posibles pérdidas de sustancias. Se realiza una digestión básica durante 24 horas a temperatura ambiente y en agitación magnética constante. Una vez terminada la digestión se comienza el filtrado del volumen para eliminar todos los sólidos suspendidos que puedan quedar de la mezcla; para ello se utiliza la bomba de vacío, el embudo Büchner con el filtro fibra de vidrio colocado en él y un matraz Büchner, característico por tener 2 cuellos, uno en la parte superior y otro lateral de menor tamaño; este matraz se

utiliza para recoger el líquido filtrado y libre de sólidos, está conectado a la bomba de vacío por el cuello lateral y más pequeño, y por el cuello ancho al embudo ajustado con gomas para que no haya pérdidas y pueda crear el vacío; por el embudo se irá vertiendo la solución.



Figura 32: Montaje experimental: Bomba de vacío y matraz y embudo Büchner



Figura 33: Embudo y matraz Büchner

El filtrado se debe realizar poco a poco, vertiendo pequeñas cantidades de volumen en el embudo y esperando a que este se filtre quedando una especie de galleta semisólida y seca en el filtro. Si el filtro de fibra de vidrio colmata, causando por lo tanto que el volumen quede obstruido y no se filtre, se debe cambiar el filtro; si ha colmatado antes de poder filtrar el volumen que se le ha vertido se debe depositar este volumen en un vaso de precipitado, cambiar el filtro y volver a verter el volumen anterior, intentado perder el menor volumen de la mezcla posible durante el filtrado. El filtro se debe cambiar cada vez que el volumen vertido se filtre por completo para conseguir la mayor eficacia de este método. Además, entre filtrados se debe tapar el Erlenmeyer y dejar en agitación magnética, para que los sólidos no se precipiten en el fondo del matraz, ya que si precipitan el inicio del filtrado sería más rápido por la baja concentración en sólidos en suspensión en el líquido y cuando hubiese que filtrar el fondo sería un proceso más lento debido a la acumulación de sólidos y la escasez de líquido, dificultando el filtrado.

Como las extracciones llevan varios días la solución se debe almacenar en la nevera tapada con Parafilm y sin agitación.

Cuando ya se haya filtrado todo el volumen del Erlenmeyer, en el matraz de dos cuellos quedará una solución libre de sólidos en suspensión. Este líquido se debe traspasar a una botella y marcar para almacenar en la nevera.

La siguiente extracción es a pH 11, en este caso la cantidad de KOH añadida a la disolución varía respecto a la primera extracción, por ello se vuelven a realizar los cálculos de masa de KOH necesaria, que se especifican en la **Ecuación 4**, dando como valor 0.033 g de KOH, pero este valor es muy pequeño por lo que se dificulta su pesaje, por ello se realiza una dilución de la solución a pH 13, por lo que para alcanzar el pH hace falta un volumen de 2.5 mL de la disolución anterior (**Ecuación 6**). Una vez alcanzado el valor de pH deseado para esta nueva extracción el resto de procedimiento coincide con el realizado para la extracción a pH 13.

La última extracción es a pH 9, la masa de KOH que se necesita para alcanzar dicho pH es de  $3.3 \cdot 10^{-4}$  g de KOH (**Ecuación 7**), pero sucede como en la disolución a pH 11, se trata de un valor muy pequeño por lo que se utiliza la disolución a pH 13 para mediante una dilución obtener la de pH 9, el volumen necesario según la **Ecuación 8** es de 25  $\mu$ L de la disolución a pH 13. Tras alcanzar el pH deseado para esta solución realizar la extracción como anteriormente.

Una vez se tienen las tres extracciones a diferentes pH se realizan diluciones 1:100, es decir, 1 mL de la muestra extraída en 100 mL de agua destilada; estas diluciones se emplean para los diferentes estudios, ya que el volumen sin diluir está muy concentrado.

Se debe tener en cuenta que en este proyecto no se realiza la purificación, esta sería la última parte teórica en la extracción de las sustancias tipo húmicas; pues para esta parte son necesarias membranas de las que no se tiene disponibilidad por lo que con las extracciones se procede a realizar diferentes estudios, teniendo en cuenta en los futuros resultados que las extracciones deberían haber sido pasadas por un conjunto de membranas para conseguir su purificación y eliminación de posibles sustancias como carbohidratos, proteínas, lípidos, etc., extraídas de forma errónea durante el proceso de extracción.

### 3.4.3. Estudios muestras

Con las diluciones 1:100 se realizan los siguientes estudios a cada una de las muestras:

- TOC: Carbono orgánico total líquido
- DLS: Dispersión de luz dinámica
- Fluorescencia: Espectrofluorímetro
- DQO: Demanda química de oxígeno
- Determinación de hierro en disolución: Espectrofotómetro

#### 3.4.3.1. Método de la orto-fenantrolina

Este ensayo se realiza para cuantificar mediante espectrofotometría el contenido en hierro en las diferentes diluciones de las extracciones anteriores, es decir, para conocer su capacidad complejante y estudiar si es posible que las sustancias tipo húmicas extraídas puedan

complejar hierro. Este se basa en la formación de complejos con alta absorbancia por la formación de iones metálicos, por la reacción del  $\text{FeCl}_3$  con la 1,10-fenantrolina con el extracto de la muestra, dando lugar un complejo de color rojo-naranja con una absorptividad del complejo de 510 nm como longitud de onda.

Se debe buscar la estabilidad del ensayo a tres pH distintos, pH 5, 6 y 7, a estos pH el hierro no precipita porque forma complejos con el extracto; a cada uno de estos pH se debe comprobar la capacidad complejante de los extractos anteriores, que eran a pH 9, 11 y 13, para así poder realizar una comparativa entre los distintos valores obtenidos. Además, de un ensayo base a pH 3, para tomar sus valores como referencia; ya que a pH 3 hay total solubilidad del  $\text{Fe}^{3+}$ , como se puede observar en la **Figura 34**, donde se ve como a un pH superior a este el hierro forma hidróxido de hierro ( $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ), siendo sólido y precipitando y no pudiendo ser absorbido por las raíces de las plantas.

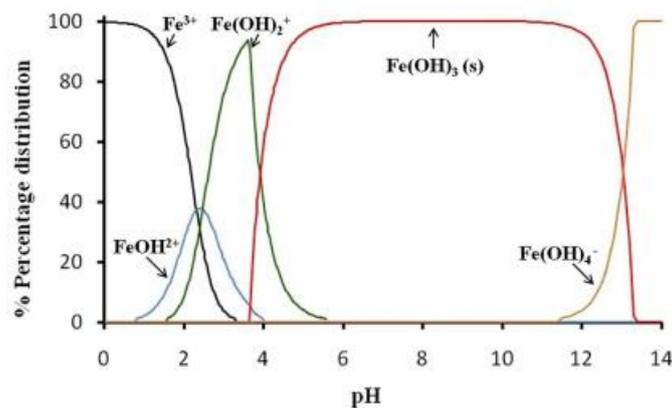


Figura 34: Diagrama del estado del hierro en función del pH<sup>[50]</sup>

Las condiciones del ensayo son que en la disolución de cada extracto la cantidad de carbono necesaria debe ser de 25 mg/ L COD y el contenido en hierro de 10 mg/ L  $\text{Fe}^{3+}$ .

El procedimiento a seguir en cada uno de los ensayos será el mismo, teniendo en cuenta que en cada uno se debe alcanzar un pH distinto y que el volumen de extractante variará también. En el caso de los extractos a pH 9 en una probeta y con la posterior ayuda de una pipeta, se debe medir el volumen necesario, que es 68.127 mL (**Ecuación 9**) de la dilución 1:100 anteriormente preparada, después este líquido traspasarlo a un matraz aforado de 250 mL y enrasar con agua destilada. Una vez listo, verter la dilución en un vaso de precipitados y llevar al pH-metro para conocer su pH. Mientras se deben preparar 8 viales, estos contendrán 1 mL de orto-fenantrolina, 1 mL del tampón acético, ácido ascórbico en muy poca cantidad y 4 mL de la disolución; el primer vial a preparar debe contener los 4 mL de la disolución que se ha llevado al pH-metro y que aún no contiene hierro, ya que este será el blanco para el espectrofotómetro. Después pesar la masa necesaria de  $\text{FeCl}_3$  para que en la disolución el contenido en  $\text{Fe}^{3+}$  sea de 10 mg/ L; este valor para un volumen de 250 mL es de 12.1 mg de

$\text{FeCl}_3$  (**Ecuación 13**). Verter el cloruro férrico en la dilución anterior y mantener en agitación magnética para que se disuelva correctamente en todo el volumen; medir el pH y ajustarlo hasta conseguir el pH deseado, estos son pH 5,6 o 7; por lo que se debe añadir NaOH en concentración 0.1 M o 1 M del ya preparado (**3.1.4**) si lo que se desea es subir el pH, es decir, que sea un pH más básico; o añadir  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (**3.1.5**) también en concentración 0.1 M o 1 M, cuando se desea alcanzar un pH más ácido. Un vez ajustado el pH iniciar el cronómetro, la primera muestra se debe tomar al tiempo 0; es decir, añadir 4 mL de esta disolución ya en el pH correcto a uno de los viales anteriormente preparados, cuando estos 4 mL se añaden al vial se debe cronometrar con otro cronómetro el tiempo que se tarda desde que se añade la disolución al vial hasta que se pasa a la cubeta de cuarzo para el espectrofotómetro. Las siguientes medidas deben ser a los 5, 10, 15, 30, 45 y 60 minutos; cada medida empleará un vial nuevo de los preparados anteriormente más 4 mL de la muestra al tiempo que toca; se debe tener en cuenta que entre una muestra y otra se debe limpiar la cubeta de cuarzo empleada y la punta de la micropipeta utilizada para evitar que posibles restos que queden en estos materiales se oxiden y alteren los siguientes resultados. Con este procedimiento se consigue estudiar la acción del complejante a lo largo de una hora.

En el caso de los extractos a pH 11 el volumen necesario para cumplir las condiciones es de 61.275 mL (**Ecuación 10**) de la dilución 1:100 del extracto. En el caso de los extractos a pH 13 el volumen necesario es de 29.069 mL (**Ecuación 11**) de la dilución 1:100 del extracto a pH 13.

#### 3.4.4. Ensayo de germinación

Este ensayo se realiza para comprobar si las sustancias tipo húmicas extraídas poseen actividad fertilizante, a pesar de no haber pasado por un tratamiento de membranas y una purificación. Ya que en este ensayo no se adiciona hierro por que el objetivo no es la nutrición férrica de las semillas sino la comprobación de si las sustancias tipo húmicas extraídas son capaces de mejorar por si solas las características de un suelo agrícola y proporcionar propiedades positivas al crecimiento de las plantas, comprobando así si se encuentran sustancias tóxicas en las extracciones.

Este ensayo consiste en cultivar semillas en placas Petri y llevarlas a incubadora para simular sus condiciones óptimas de crecimiento. Desde el punto de vista de la agricultura una semilla se considera que ha germinado cuando de ella crece una planta adulta capaz de producir sus propias semillas, es decir, se puede reproducir.

El ensayo va a ser realizado por duplicado, con la diferencia de que uno de ellos será humidificado con agua destilada y el otro bajo una situación de estrés al ser las semillas humidificadas con una disolución salina. En cada uno de los ensayos se realiza la germinación en semillas bañadas en agua destilada, en agua salada, en el sustrato del alperujo anteriormente extraído y diluido 1:100, y también bañadas en bioestimulante comercial.

El primer paso para comenzar el ensayo es la preparación de la disolución salina y de la dilución del bioestimulante; para la disolución salina se prepara una disolución de 1 L con 2.922 g de NaCl (*Ecuación 14*). Para la preparación de la dilución del bioestimulante se preparan 50 mL con una concentración de 1:40, para ello se necesitan 1.25 mL de bioestimulante (*Ecuación 15*). Después, se procede a la preparación de las semillas, para ello se deben tomar 5 tubos de ensayo de plástico colocarlos en una rejilla y en cada uno de ellos introducir 100 semillas de tomate. Para la cuenta de las semillas se deben desinfectar unas pinzas con etanol para asegurarse que estas queden limpias y al tocar las semillas no sean infectadas de bacterias que más tarde bajo las condiciones adecuadas se reproduzcan. Una vez los 5 tubos estén listos introducir el sustrato con el que se van a impregnar cada uno, es importante que todas las semillas queden cubiertas con el líquido empleado, como se observa en la *Figura 35*, y llevar al agitador mecánico rotativo, mostrado en la *Figura 19*, durante 1 hora para que todas las semillas se empapen del sustrato.



*Figura 35: Semillas bañadas en sustrato*

Mientras las semillas están en rotación preparar las placas Petri, se deben preparar 16 placas para las de riego con agua destilada y otras 16 placas para las de riego salino; de estas 16 placas empleadas en cada uno de los ensayos serán 4 placas destinadas a los distintos sustratos. La preparación de las placas consiste en colocar el papel de filtro en la base de la placa y marcarla para poder diferenciarlas, como se muestra en la *Figura 36*. En la *Figura 37* se muestran las 16 placas del ensayo salino colocadas en filas las 4 placas destinadas al mismo sustrato.



Figura 36: Preparación Placa Petri

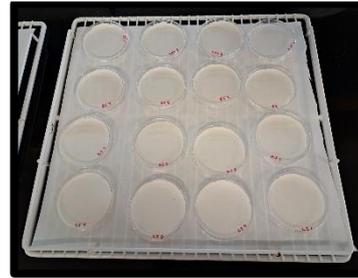


Figura 37: Placas Petri ensayo

Tras la hora en rotación verter el contenido de los tubos en un papel de filtro, tener cuidado de que el contenido de cada uno de los tubos quede separado entre ellos para evitar que se mezclen las semillas; este paso se realiza para quitar el exceso de líquido de las semillas por lo que cuando se depositan en el papel de filtro se deben separar con ayuda de unas pinzas o la mano con un guante. El procedimiento es como se muestran en la **Figura 38** y en la **Figura 39**.

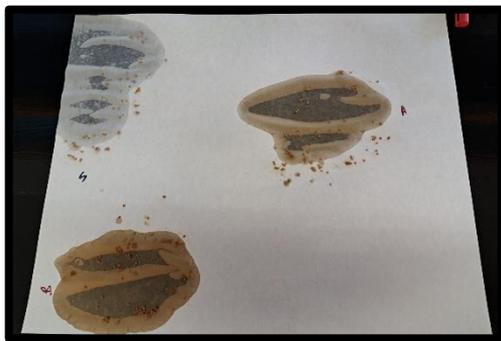


Figura 38: Secado semillas en sustrato salino, de alperujo y de bagazo

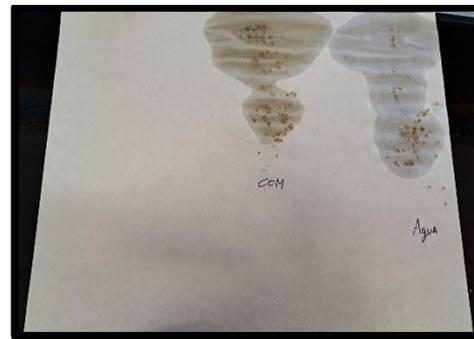


Figura 39: Secado semillas en sustrato comercial y agua

Cuando las semillas ya se han secado, son aproximadamente unos 5- 10 minutos lo que se demoran, se colocan 12 semillas de manera que queden separadas entre ellas, como se muestra en la **Figura 40** y en la **Figura 41** para que cuando comiencen su germinación no se molesten entre ellas, en las 32 placas Petri preparadas anteriormente; una vez colocadas regar con la disolución asignada a cada muestra, es decir, 16 placas serán regadas con agua destilada y las otras 16 con la disolución salina, para provocar una situación de estrés en su crecimiento y ver cómo les afecta.

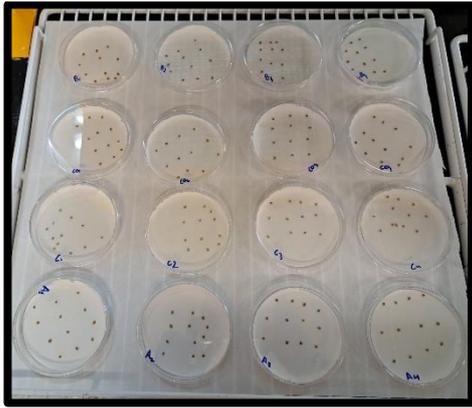


Figura 40: Colocación semillas riego agua destilada

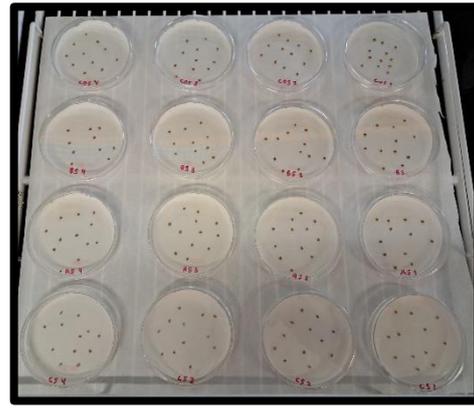


Figura 41: Colocación semillas riego agua salada

Después llevar a la incubadora a una temperatura de 28°C, sin luz ya que las raíces no realizan la fotosíntesis por lo que no es necesario el aporte de luz para su crecimiento. En este tipo de ensayo al tratarse de semillas de tomate el riego se debe realizar de forma alterna, siendo un día sí y otro no; y la medición de las raíces se realiza también de forma alterna, ya que estas semillas tienen un crecimiento más tardío, pero los días distintos al día de riego. Por lo que el procedimiento será de la siguiente manera:

- El día de la preparación del ensayo regar cada placa Petri con su sustrato correspondiente, el riego se realiza con pipetas desechables extendiendo el contenido líquido de esta por toda la placa, con el objetivo de que quede el filtro cuantitativo de la sección **3.2.6** empapado, para que las semillas tomen el sustrato de él, pero sin excederse ya que no se busca que las semillas queden sumergidas en el sustrato; después llevarlas a la incubadora.
- Pasadas 24 horas se realiza una muestreo para anotar aquellas semillas que ya están empezando a romper, esto es que no se puede medir aún la longitud de su raíz, pero sí que se aprecia como la semilla se abulta por uno de sus lados que será por el que crezca la raíz llegado el momento. Al terminar el muestreo regar las placas con el sustrato correspondiente (agua salina o agua destilada) a cada ensayo como se ha explicado anteriormente. Después, devolver a la incubadora.
- Tras 48 horas hacer la medición de las semillas que hayan comenzado su germinación, para ello se emplea un pie de rey, la caja de luz, mostrada en el apartado **3.3.10**, unas pinzas y etanol para la desinfección de las pinzas y de la mesa de luz entre un ensayo y otro. Para la medición se selecciona una de las placas Petri del ensayo, se toma una de las semillas con ayuda de las pinzas anteriormente desinfectadas, se mide con cuidado de no romper su raíz, también tener en cuenta que la mayoría de las raíces no crecen de forma recta, si no que hacen curvas a lo largo de su crecimiento, por lo que su medición se complica, para ello la forma más fácil de asegurarse una correcta mediada sin quebrar la raíz es medirla por tramos rectos; después, anotar su longitud o la suma de estas longitudes y retornar la semilla a la placa; este procedimiento será

el realizado con cada una de las semillas de la placa de ensayo. Al cambiar de placa Petri se debe limpiar con etanol la caja de luz y las pinzas, para así evitar posibles contaminaciones cruzadas entre las semillas de un ensayo y las de otro.

Los resultados se anotan sin hacer diferenciación dentro de la misma placa Petri entre unas semillas y otras, ya que para los resultados interesa la media diaria del crecimiento de estas y no lo que ha podido crecer cada una. Llevar nuevamente a la incubadora.

- El tercer día de riego es a las 72 horas de ensayo, se humedecen las muestras con el sustrato asignado a cada ensayo y se devuelven a la incubadora.
- El segundo día de mediciones es a las 96 horas, se realiza el mismo procedimiento que en las 48 horas, anotando todas las medidas de las raíces ya en desarrollo.
- El último día de riego es a las 120 horas, con la diferencia de que este último riego se realiza con agua de red para ambos ensayos, en lugar, de con agua salina y agua destilada, ya que se considera que los cultivos ya han sido excitados en exceso y que si se siguen regando con los sustratos anteriores es posible que mueran o que su desarrollo no sea el óptimo. Después llevar a la incubadora nuevamente.
- A las 144 horas será el último día de mediciones, el procedimiento a seguir será el mismo que los anteriores días de mediciones. Al ser el último día y estar ya las raíces más desarrollados es posible que de algunas semillas al final de la raíz se vea un pequeño tallo verde, esto es un brote, este se debe medir y anotar su tamaño también en un apartado distinto.

Los resultados obtenidos de este ensayo se muestran en el apartado de resultados **Capacidad bioestimulante: Ensayo de germinación.**

### 3.5. Cálculos

Los cálculos realizados en cada uno de los procedimientos experimentales del trabajo se muestran en este apartado.

#### 3.5.1. Humedad

Para conocer el contenido en humedad de las muestras del apartado **Humedad muestras** se realizan los siguientes cálculos, conociendo los pesos iniciales y finales de las 4 muestras realizadas.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
<b>Peso vidrio de reloj vacío (g)</b>	37.0135	37.0198	37.3752	42.6257
<b>Masa de residuo (g)</b>	10.0343	10.0744	9.9989	10.0137
<b>Peso vidrio de reloj + residuo húmedo (g)</b>	47.0478	47.0942	47.3741	52.6394
<b>Peso vidrio de reloj + residuo seco (g)</b>	40.8027	40.8023	41.2288	46.6491

Tabla 11: Datos humedad

La ecuación consiste en calcular la diferencia que hay entre el peso del vidrio de reloj con el alperujo sin haber pasado por la estufa, y por lo tanto la muestra húmeda, con el peso de las muestras secas.

Ecuación 1: Cálculo humedad

$$[\text{Peso vidrio de reloj} + \text{residuo húmedo (g)}] - [\text{Peso vidrio de reloj} + \text{residuo seco (g)}] = \text{Peso residuo seco (g)}$$

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4
<b>Diferencia</b>	6.2451	6.2917	6.1453	5.9903
<b>Porcentaje (%)</b>	62.451	62.917	61.453	59.903

Tabla 12: Cálculo humedad

### 3.5.2. Masa de KOH

Para conocer la cantidad exacta de KOH a emplear en para la **Preparación extracciones**, y así alcanzar el pH deseado para cada una de las disoluciones se emplea la definición de pH y pOH. El pH es el potencial de hidrógeno de una sustancia, y se expresa como  $\text{pH} = -\log [H^+]$ , ya que es la concentración de cationes de hidrógeno; mientras que el pOH es el potencial de hidronio, se expresa como  $\text{pOH} = -\log [OH^-]$ , ya que es la concentración de aniones de hidronio.<sup>[48]</sup>

Ecuación 2: Relación pH- pOH

$$\text{pH} = -\log[H^+]$$

$$\text{pOH} = -\log[OH^-]$$

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14$$

Ahora conocida esta relación se procede a calcular la cantidad de KOH con una concentración de 1 M necesaria para alcanzar un pH 13.

Ecuación 3: Cálculo KOH en pH 13

$$\text{pH} + \text{pOH} = 14 \rightarrow 13 + \text{pOH} = 14 \rightarrow \text{pOH} = 1$$

$$\text{pOH} = 1 = -\log[OH^-] = 10^{-1} = 0.1M$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M_r}}{V} \rightarrow m = M \cdot M_r \cdot V = 0.1M \cdot \frac{56.11g}{mol} \cdot 0.5L \rightarrow m = 2.806g \text{ KOH}_{100\%}$$

$$m_{85\%} = \frac{m_{100\%}}{\text{Pureza}} \rightarrow m_{85\%} = \frac{2.806g \text{ puro}}{0.85} \rightarrow m_{85\%} = 3.3 \text{ g de KOH}_{85\%}$$

Al encontrarse el reactivo empleado al 85 % en pureza, dato ya mencionado en la **Tabla 1**, el cálculo debe ajustarse a esta pureza.

Con la misma relación de la **Ecuación 2** se calcula la cantidad necesaria de KOH para alcanzar un pH 11 con una concentración de 1 M.

*Ecuación 4: Cálculo KOH en pH11*

$$pH + pOH = 14 \rightarrow 11 + pOH = 14 \rightarrow pOH = 3$$

$$pOH = 3 = -\log[OH^-] = 10^{-3} = 0.001M$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M_r}}{V} \rightarrow m = M \cdot M_r \cdot V = 0.001M \cdot \frac{56.11g}{mol} \cdot 0.5L \rightarrow m = 0.02806g KOH_{100\%}$$

$$m_{85\%} = \frac{m_{100\%}}{Pureza} \rightarrow m_{85\%} = \frac{0.02806g \text{ puro}}{0.85} \rightarrow m_{85\%} = 0.033 g \text{ de } KOH_{85\%}$$

Al ser una masa tan pequeña se vuelve a elaborar la disolución a pH 13 y se diluye con la siguiente ecuación:

*Ecuación 5: Dilución soluciones*

$$C \cdot V = C_1 \cdot V_1$$

Donde:

*Ecuación 6: Dilución pH 11*

$$0.1M \cdot V = 0.001M \cdot 250mL \rightarrow V = 2.5mL$$

Por último, se utiliza nuevamente la **Ecuación 2** para el cálculo de la masa necesaria de KOH para alcanzar un pH 9.

*Ecuación 7: Cálculo KOH en pH9*

$$pH + pOH = 14 \rightarrow 9 + pOH = 14 \rightarrow pOH = 5$$

$$pOH = 5 = -\log[OH^-] = 10^{-5} = 0.00001M$$

$$M = \frac{n}{V} = \frac{\frac{m}{M_r}}{V} \rightarrow m = M \cdot M_r \cdot V = 0.00001M \cdot \frac{56.11g}{mol} \cdot 0.5L \rightarrow$$

$$m = 2.806 \cdot 10^{-4}g KOH_{100\%}$$

$$m_{85\%} = \frac{m_{100\%}}{Pureza} \rightarrow m_{85\%} = \frac{2.806 \cdot 10^{-4}g \text{ puro}}{0.85} \rightarrow m_{85\%} = 3.3 \cdot 10^{-4} g \text{ de } KOH_{85\%}$$

En este caso sucede lo mismo que en la disolución de pH 11, la masa de KOH necesaria para alcanzar el pH requerido es muy pequeña, por lo que se utiliza nuevamente la **Ecuación 5**, quedando:

*Ecuación 8: Dilución pH 9*

$$0.1M \cdot V = 0.00001M \cdot 250mL \rightarrow V = 0.025mL = 25\mu L$$

### 3.5.3. Volumen extractos

Para llevar a cabo este cálculo es necesario conocer la concentración de COD especificada en el apartado de resultados **4.2.1**. Una vez obtenido este dato se debe calcular el volumen necesario a cada uno de los pH (pH 9, 11 y 13) para que en un volumen de disolución de 250 mL haya 25 mg/ L COD de concentración conociendo la concentración de COD presente en cada una de las extracciones anteriores gracias al ensayo de Carbono Orgánico Total (TOC). Este cálculo es necesario para el apartado **3.4.3.1**.

#### 3.5.3.1. Volumen extracto a pH 9

A pH 9 el valor de COD es de 9174 mg/ L (**4.2.1**), pero este valor es de una muestra sin diluir y como se debe alcanzar una concentración de 25 mg/ L resulta más fácil trabajar con la extracción diluida a 1:100, siendo el valor de COD 91.74 mg/ L, por lo que mediante la **Ecuación 5** se calcula el volumen necesario de extracto a pH 9 para que el contenido en un volumen de 250 mL sea de 25 mg/L COD.

*Ecuación 9: Cálculo volumen extracto pH 9*

$$25 \frac{mg}{L} \cdot 250 mL = 91.74 \frac{mg}{L} \cdot V_1 \rightarrow V_1 = 68.127 mL \text{ de pH } 9$$

#### 3.5.3.2. Volumen extracto a pH 11

A pH 11 en la extracción diluida el valor de COD es de 102 mg/L (**4.2.1**), por lo que mediante la **Ecuación 5** se calcula el volumen necesario de extracto a pH 11 para que el contenido en un volumen de 250 mL sea de 25 mg/L COD.

*Ecuación 10: Cálculo volumen extracto pH 11*

$$25 \frac{mg}{L} \cdot 250 mL = 102 \frac{mg}{L} \cdot V_1 \rightarrow V_1 = 61.275 mL \text{ de pH } 11$$

#### 3.5.3.3. Volumen extracto a pH 13

A pH 13 en la muestra diluida 1:100 el valor de COD es de 215 mg/L (**4.2.1**), por lo que mediante la **Ecuación 5** se calcula el volumen necesario de extracto a pH 13 para que el contenido en un volumen de 250 mL sea de 25 mg/ L COD.

*Ecuación 11: Cálculo volumen extracto pH 13*

$$25 \frac{mg}{L} \cdot 250 mL = 215 \frac{mg}{L} \cdot V_1 \rightarrow V_1 = 29.069 mL \text{ de pH } 13$$

### 3.5.4. Masa FeCl<sub>3</sub>

Para la determinación de la estabilidad de los complejos de hierro se necesitan 10 mg/ L de Fe<sup>3+</sup> a partir de FeCl<sub>3</sub>, por lo que se debe calcular la masa de cloruro férrico hexahidratado necesaria para alcanzar ese valor de Fe<sup>3+</sup> requerido.

Elemento químico	Peso molecular (g/ mol)
FeCl <sub>3</sub>	270.32

Fe	55.85
Cl	35.45

Tabla 13: Datos FeCl<sub>3</sub>

Primero se debe calcular el porcentaje de hierro y cloro que hay en el cloruro férrico:

Ecuación 12: Cálculo porcentaje FeCl<sub>3</sub>

$$\frac{M_{r\text{elemento}}}{M_{r\text{compuesto}}} \cdot 100 = \%_{\text{elemento}}$$

$$\frac{55.85}{270.32} \cdot 100 = 20.66 \% Fe$$

$$35.45 \cdot 3 = 106.35 \rightarrow \frac{106.35}{270.32} \cdot 100 = 39.34 \% Cl$$

El contenido en hierro en el FeCl<sub>3</sub> es del 20.66 % y el del Cl de 39.34 %, el resto hasta llegar al 100 % es el contenido en agua, ya que se trata de cloruro férrico hexahidratado. Para conocer la cantidad que se debe poner se realiza la siguiente ecuación:

Ecuación 13: Cálculo masa FeCl<sub>3</sub>

$$\frac{\frac{10mg}{L}}{0.2066 Fe} = 48.40 mg \text{ de Fe en } 1 L$$

Y las diluciones deben tener un volumen de 250 mL, por lo que:

$$48.40mg \cdot \frac{0.25L}{1L} = 12.1 mg \text{ de Fe en } 250 mL$$

### 3.5.5. Masa NaCl

Se debe calcular la cantidad de NaCl necesaria en 1 L de agua para su uso en el apartado **Ensayo de germinación**, con una molaridad al 50 mM de NaCl. Por lo que:

Ecuación 14: Cálculo NaCl

$$M = \frac{n}{V} \rightarrow n = M \cdot V = 50 \cdot \frac{10^{-3}mol}{L} \cdot 1L \rightarrow n = 0.05 mol NaCl$$

$$n \cdot M_r = m \rightarrow 0.05 mol \cdot 58.44 \frac{g}{mol} = m \rightarrow m = 2.922 g NaCl$$

El peso molecular del cloruro de sodio se especifica en la **Tabla 9**.

### 3.5.6. Masa bioestimulante

El bioestimulante se emplea en el apartado **Ensayo de germinación**, pero este se debe diluir para emplearlo en el ensayo. La dilución debe ser con una concentración de 1:40 en 50 mL, por lo que:

*Ecuación 5: Cálculo de diluciones*

$$C \cdot V = C_1 \cdot V_1$$

Donde:

*Ecuación 15: Cálculo bioestimulante*

$$50\text{mL} \cdot \frac{1}{40} M = 1M \cdot V_1 \rightarrow V_1 = 1.25 \text{ mL}$$

## 4. Resultados

Los resultados obtenidos de cada uno de los ensayos anteriores se muestran a continuación; estos se muestran divididos en los ensayos realizados a los residuos del alperujo y los ensayos realizados a los extractos de este.

### 4.1. Caracterización de los residuos

Al residuo de alperujo antes de realizarle las extracciones anteriormente explicadas se caracteriza para valorar su porcentaje en humedad, en carbono, en carbono orgánico oxidable, además de un análisis elemental.

#### 4.1.1. Porcentaje de humedad

En la **Tabla 12: Cálculo humedad** se muestra el contenido en humedad de las muestras, con estos valores calcular la media aritmética para así conocer el porcentaje media de humedad de las muestras tomadas.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Media
Porcentaje (%)	62.451	62.917	61.453	59.903	61.681

Tabla 14: Porcentaje de humedad total

Las muestras 1 y 2 se secaron en estufas a 105°C, por lo que se puede observar que su contenido en agua es mayor, ya que ha perdido mayor cantidad de líquido al ser secadas debido a las elevadas temperaturas. Sin embargo, las muestras 3 y 4 fueron secadas en una estufa a una temperatura menor, 50°C, por lo que el contenido en líquido que pierde al secarse es menor debido a que la temperatura también es menor. Pero los porcentajes realmente sufren una ligera variación debido al cambio de temperatura entre muestras por lo que el porcentaje total de humedad se calcula de las cuatro muestras en conjunto, siendo del 61.681 % la humedad presente en el residuo de alperujo estudiado.

#### 4.1.2. Porcentaje de carbono

El porcentaje en carbono se conoce gracias al TOC sólido que se eleva hasta las temperatura de 900°C y donde se introducen las muestras una vez pasadas por la estufa para conocer el contenido en carbono presente en ellas.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Media
Porcentaje carbono (%)	60.91	59.02	58.36	64.80	60.77

Tabla 15: Porcentaje de carbono

El contenido medio en carbono de las 4 muestras tomadas en estado sólido es de 60.77 % en C.

#### 4.1.3. Análisis alperujo

El análisis porcentual del contenido en materia del alperujo es un ensayo realizado por servicios de investigación externos a la UPV, más concretamente por la Universidad de Alicante (UA), se realiza mediante un equipo de DSC, calorimetría diferencial de barrido (3.3.11), en el que gracias a la temperatura se obtienen los siguientes resultados:

	<b>Porcentaje (%)</b>
<b>Cenizas</b>	2.15
<b>Hemicelulosa</b>	28.00
<b>Celulosa</b>	7.23
<b>Lignina</b>	28.39

Tabla 16: Análisis alperujo

Como se puede observar este residuo contiene un alto porcentaje de lignina, esto es una sustancia natural presente en la pared celular de las células vegetales esto se puede deber a que el alperujo se compone entre otros materiales del hueso de las olivas, los cuales tiene un alto contenido en lignina, celulosa y hemicelulosa.

El análisis elemental también se ha realizado por un órgano externo a la UPV, la Universidad de Alicante se ha encargado de este ensayo (3.3.12).

<b>Elemento (g/ kg)</b>	
<b>Ca</b>	3.94 ± 0.14
<b>K</b>	2.8 ± 0.2
<b>Mg</b>	0.8 ± 0.2
<b>Elemento (mg/ kg)</b>	
<b>P</b>	220 ± 16
<b>Na</b>	73 ± 8
<b>Ni</b>	1.25 ± 0.09
<b>Fe</b>	77.7 ± 1.1
<b>Cu</b>	6.8 ± 0.3
<b>Zn</b>	14.51 ± 1.3
<b>Mn</b>	11.7 ± 0.6
<b>Cr</b>	1.77 ± 0.15
<b>Cd</b>	0.010 ± 0.007
<b>Pb</b>	0.147 ± 0.008

Tabla 17: Análisis elemental alperujo

Como se puede observar los elementos que se encuentran en mayor cantidad son el calcio, el potasio y el magnesio, ya que se encuentran en cantidades medidas en g/ kg; mientras que el resto de los elementos se encuentran en mg/ kg, por lo tanto, en menor medida. Es importante controlar la concentración de metales peligrosos como el cromo o el plomo ya que su presencia por encima de ciertos valores (2 mg/ kg) puede imposibilitar su uso como fertilizante.

## 4.2. Caracterización de los extractos

Una vez realizadas las extracciones se pasa a la caracterización de las disoluciones 1:100 de estas.

Las extracciones habitualmente se realizan a pH altamente alcalinos, entre 13 y 14; el problema de realizarlas a tan altos pH es el empleo del material para alcanzar el pH deseado para la extracción, ya que la muestra se encuentra en un pH más bajo, y, además, posteriormente los residuos generados de estas extracciones que se encontrarán a pH básicos siendo su eliminación de mayor coste que si fuese un pH neutro. Por lo que se desea probar si con un pH no tan alcalino (pH 11) y otro más medio (pH 9) es posible realizar una correcta extracción permitiendo reducir el uso de reactivos; y que además también permita la extracción de sustancias tipo húmicas de forma óptima, para el uso que se le quiere dar en este trabajo.

### 4.2.1. TOC: Carbono orgánico total

Este ensayo se realiza para conocer la cantidad de materia orgánica presente en las muestras en estado líquido, por lo que se trata de un indicador para conocer la cantidad de materia orgánica disuelta en las diferentes extracciones.

En la **Tabla 18** se encuentran los valores de este ensayo, observándose como a un mayor pH el contenido en carbono por litro es mayor, esto es debido a que a un pH más alto las extracciones son más efectivas, siendo mayor la cantidad de materia orgánica extraída y por lo tanto la de carbono también.

	<b>COD (mg C/ L)</b>
<b>pH 9</b>	9174
<b>pH 11</b>	10200
<b>pH 13</b>	21500

Tabla 18: Valores TOC

### 4.2.2. DLS: Dispersión de luz dinámica

Mediante este ensayo se determina el tamaño y la distribución de las partículas y moléculas de los extractos. Mide el radio hidrodinámico y la anchura de la partícula por debajo del micrón, pudiendo trabajar incluso en el rango de entre 10 a 100 nm. En la **Tabla 19** se registran los valores medios de las partículas de cada extracto, estos valores superan los 100 nm, rondando aproximadamente los 260- 280 nm de tamaño debido a que en las extracciones se encuentran moléculas de mayor tamaño, que son sustancias presentes en las extracciones más grandes; y sustancias de menor tamaño.

Al observar los valores de los distintos pH se determina que a pH 9 y 13 las partículas son más pequeñas, esto puede deberse a que la filtración se ha realizado de manera más correcta o estar relacionado con el pH de la extracción. Se puede ver como la variación entre un pH y

otro no es significativo; además los valores medios tomados están por debajo del rango de tamaños típicos de las sustancias de este tipo, siendo de entre 300-600 nm.<sup>[49]</sup>

	D (nm)
pH 9	263
pH 11	276
pH 13	265

Tabla 19: Valores DLS

### 4.2.3. Fluorescencia

Este ensayo se realiza para conocer la naturaleza de los extractos, mediante el gráfico de la **Figura 42** y las matrices de excitación por emisión de fluorescencia a cada uno de los pH es posible saber qué tipo de sustancias se encuentran presentes en las muestras tomadas.

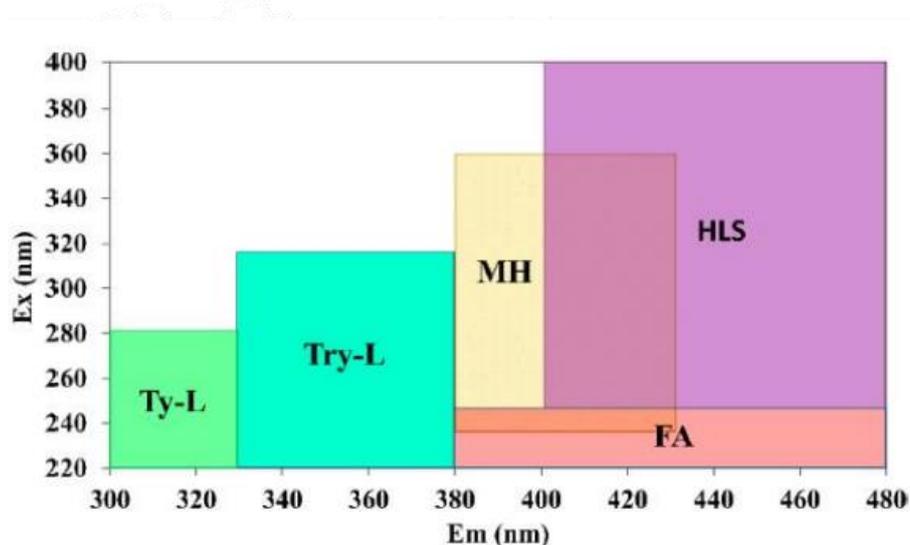


Figura 42: Regiones emisoras típicas de DOM fluorescente<sup>[51]</sup>

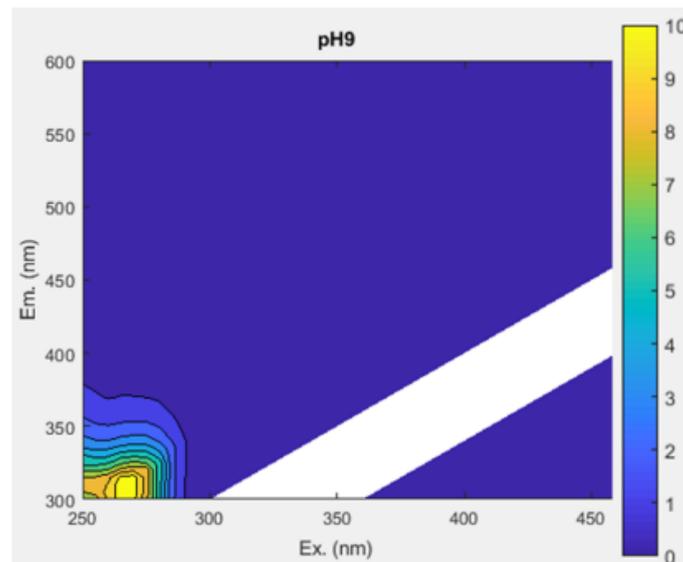
Este gráfico muestra las regiones de fluorescencia para los tipos más comunes identificados de materia orgánica disuelta (DOM) en una muestra; es decir, entre que rangos de excitación y emisión se detectan diferentes tipos de DOM mediante el espectrofluorómetro.

Los tipos diferenciados son:

- Ty- L: Sustancias tipo tirosina
- Try- L: Sustancias tipo triptófano
- MH: Sustancias tipo hímicos microbianos
- HLS: Sustancias tipo hímico
- FA: Sustancias tipo ácido fúlvico

Para el análisis de las matrices de excitación se debe tener en cuenta que en el gráfico de las regiones emisoras los ejes se encuentran invertidos a como están en las matrices de excitación.

En cuanto a la **Figura 43** se muestra la matriz de excitación de la muestra extraída a pH 9, en esta se observa como la señal de emisión va desde los 300 nm hasta los 380 nm aproximadamente y la señal de excitación hasta los 290 nm aproximadamente; por lo que contendrá sustancias tanto de tipo tirosina (Ty- L) como de tipo triptófano (Try- L); ya que las Ty- L emiten desde los 300 nm hasta los 330 nm y su señal de excitación es desde los 220 nm hasta los 280 nm, y los Try- L su señal de emisión es de los 330 nm a los 380 nm y la de excitación de los 220 nm a los 320 nm.



*Figura 43: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 9*

En la **Figura 44** se muestra la matriz de excitación de la extracción a pH 11, la señal de emisión y de excitación de la DOM de esta muestra es similar a la tomada a pH 9, por lo que las sustancias presentes en esta extracción son también de tipo tirosina (Ty- L), que emiten desde los 300 nm hasta los 330 nm y una señal de excitación desde los 220 nm hasta los 280 nm; y de tipo triptófano (Try- L), cuya señal de emisión es de los 330 nm a los 380 nm y la de excitación de los 220 nm a los 320 nm.

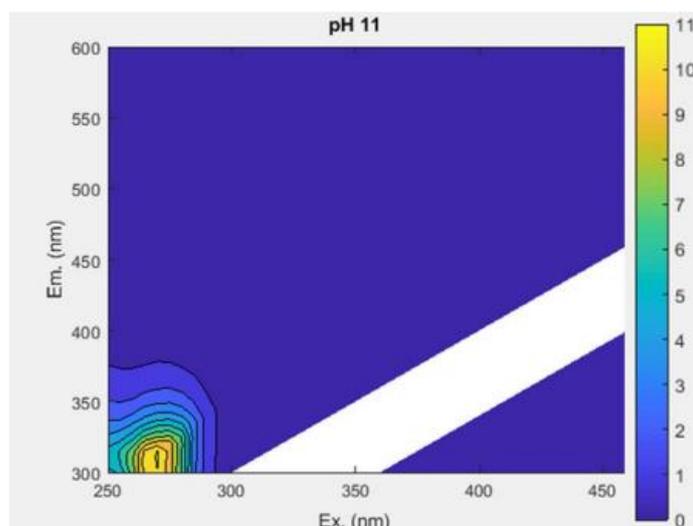


Figura 44: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 11

Por último, en la **Figura 45** se muestra la matriz de excitación a pH 13, como se puede observar a este pH la señal de emisión es mucho mayor, llegando hasta los 600 nm; al igual que la señal de excitación que alcanza los 450 nm. En este amplio rango de señales se encuentra mayor diversidad de DOM, ya que las sustancias detectadas son de tipo Ty- L, Try- L y HLS; las sustancias de tipo húmicas (HLS) se encuentran en un rango de emisión de entre 400 nm y 480 nm, con una señal de excitación de 245 nm a 400 nm, en la matriz de excitación están diferenciadas por una círculo de color amarillo.

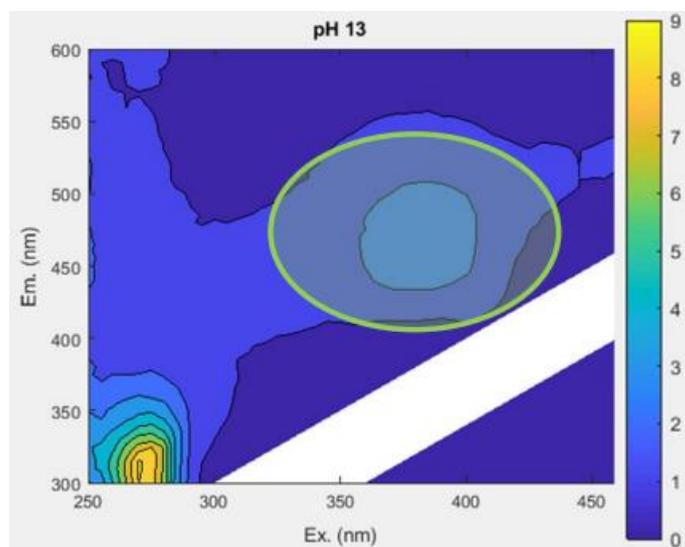


Figura 45: Matriz de excitación por emisión de fluorescencia a pH 13

En este proyecto las sustancias que son de interés y estudio son las sustancias de tipo húmicas, ya que son las de mayor tamaño y peso molecular por lo que permiten trabajar mejor con ellas; además de que complejan el hierro mejor que el resto de las sustancias encontradas en la DOM. Pero al realizar las extracciones se extraen tanto sustancias de mayor peso molecular como las de tipo húmicas, y otras de menor peso molecular como los de tipo

tirosina o triptófano; comprobándose que el pH adecuado para la extracción de sustancias tipo húmicas que son las mayor interés en este trabajo es el pH más básico posible, ya que tan solo se han extraído sustancias húmicas a pH 13 mientras que a pH 9 y 11 no se detectan señales de este tipo de sustancias en este ensayo.

#### 4.2.4. Capacidad complejante: Ensayo o-fenantrolina

Este ensayo se realiza a tres pH distintos que son pH 5, pH 6 y pH 7 y a un pH de referencia, pH 3. Mediante este ensayo se cuantifica la capacidad del hierro para complejarse con los diferentes extractos extraídos con anterioridad a pH 9, pH 11 y pH 13, para así comprobar que extracción y en cuales de los pH estables presenta mayor capacidad complejante.

Este ensayo ha sido realizado por duplicado en varios de los pH ya que como el tiempo transcurrido entre tomar los 4 mL del ensayo y medirlo en el espectrofotómetro era tan importante, debido a la oxidación del hierro que se produce; en algunas ocasiones este tiempo no es bien controlado por lo que los valores entre un tiempo y otro varían notablemente, haciendo que los resultados sean incorrectos; por lo que los gráficos finales se muestran con los valores más lineales y correctos del ensayo.

En los gráficos la línea amarilla se trata del pH de referencia (pH 3) y se puede observar cómo se mantiene constante ya que al no tener extracto no se compleja el  $\text{Fe}^{3+}$  permaneciendo la concentración de hierro, 10 mg/ L, intacta; aunque pueden darse posibles variaciones debido a la oxidación del hierro. El pH que mejor compleje el hierro será el que más se aproxime al comportamiento del referencia, ya que significa que, a pesar de haberse unido el hierro con el extracto, se ha complejado una alta cantidad de  $\text{Fe}^{3+}$ .

La **Figura 46** muestra la capacidad complejante cuando el pH se ha estabilizado a 5, se observa como las diferencias entre un pH de extracción y otro no son significativas, pues, aunque la extracción a pH 13 presente menores variaciones y una concentración mayor de hierro, ya que como se ha explicado es el más cercano al pH de referencia, en el gráfico se puede observar como la variación entre unas rectas y otras es insignificante, todas complejan de manera similar el hierro.

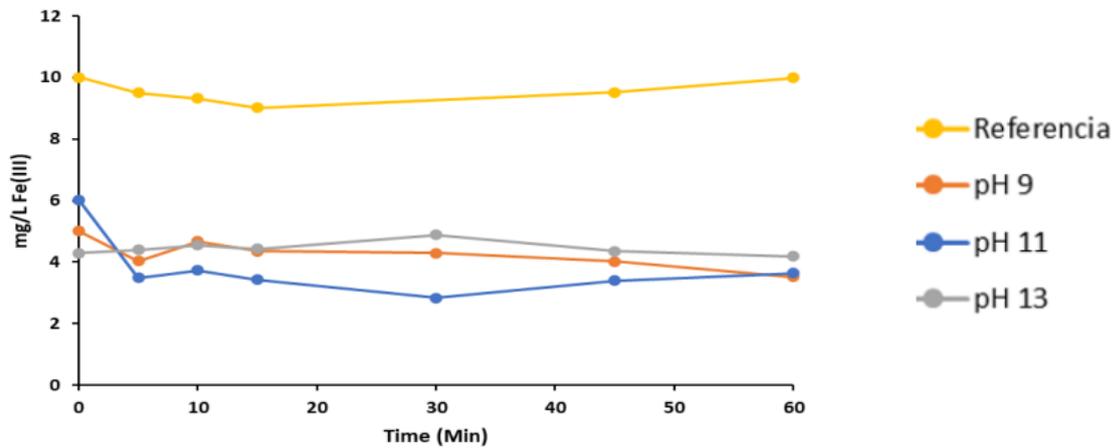


Figura 46: Estabilidad pH 5

En la **Figura 47** el pH se ha estabilizado a pH 6, como se puede observar el valor más cercano al pH de referencia es el de la muestra a pH 13, significando esto que a ese pH el hierro tiene mayor capacidad complejante, pero que a lo largo del ensayo el hierro se oxida y pierde mayor capacidad que a pH 11 y pH 9. Por lo que en este pH de estabilidad sí que se observa una mejora en el pH 13 respecto al gráfico anterior. Las muestras a pH 9 y pH 11 evolucionan de forma semejante durante todo el ensayo.

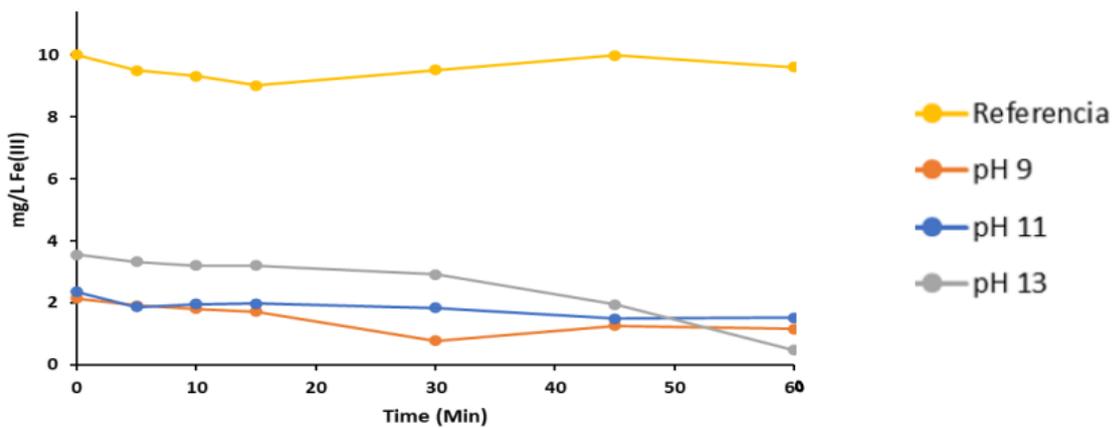


Figura 47: Estabilidad pH 6

En el último gráfico, **Figura 48**, el pH se estabiliza a pH 7, se observa como las diferencias entre los distintos pH de extracción no muestran diferencias demasiado significativas, a pesar de ello la muestra a pH 13 es la que mayor cantidad de hierro compleja, manteniéndose estable durante el ensayo. Las muestras a pH 11 y pH 9 comienzan en dos concentraciones diferentes, siendo la muestra a pH 9 más cercana a la concentración en hierro del pH 13 pero esta concentración disminuye a lo largo del ensayo; sin embargo, la muestra a pH 11 comienza con una concentración menor que después aumenta; de todas formas, ambos ensayos se mantienen uniformes.

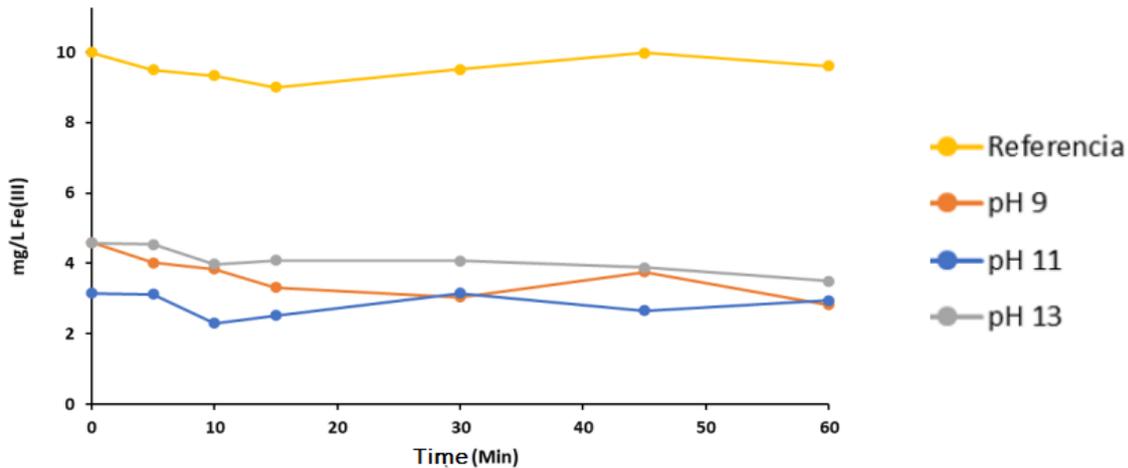


Figura 48: Estabilidad pH 7

Al comparar los tres gráficos, con los diferentes pH de estabilización se observa como en todos las diferencias entre las distintas muestras no dan resultados significativos, en los que se pueda estudiar cuál de los pH de extracción sería el óptimo para la complejación de hierro. A pesar de ello, se observa como el extracto que mayor capacidad complejante posee es la muestra a pH 13, por lo que se podría determinar que con un elevado pH las extracciones son óptimas. Además, el pH de estabilidad al que se trabaja es a pH 7, pH neutro, ya que compleja aproximadamente 5 mg Fe<sup>3+</sup>/L, mientras que a pH 6 menos de 4 mg Fe<sup>3+</sup>/L y a pH 5, compleja 4 mg Fe<sup>3+</sup>/L. Por lo que el mejor es a pH 13 estabilizado el pH en pH 7, en estos ensayos realizados de forma única y sin un gran número de muestras por lo que no ofrecen datos significativos.

#### 4.2.5. Capacidad bioestimulante: Ensayo de germinación

Este ensayo se realiza para la obtención de resultados relacionados con la posible capacidad bioestimulante del residuo de las almazaras y así poder comparar cuantitativamente diferentes lotes de muestras sometidas a diferentes tratamientos.

Los lotes se diferencian por el tipo de riego que se le ha proporcionado para humedecer las semillas, siendo riego salino o riego con agua destilada; y por el sustrato en el que han sido impregnadas las semillas antes de su cultivo, siendo agua, bioestimulante comercial y alperujo. En este ensayo no se tienen en cuenta la capacidad bioestimulante del bagazo, ya que se desea conocer la del alperujo. Los acrónimos empleados para reconocer cada cultivo son:

<b>C</b>	<b>Control:</b> Impregnadas y regadas con agua
<b>A</b>	<b>Alperujo:</b> Impregnadas en el extracto de alperujo y regadas con agua
<b>CO</b>	<b>Comercial:</b> Impregnadas en bioestimulante comercial y regadas con agua

<b>CS</b>	<b>Control salino:</b> Impregnadas y regadas en agua salina
<b>AS</b>	<b>Alperujo salino:</b> Impregnadas en el extracto de alperujo y regadas con agua salina
<b>COS</b>	<b>Comercial salino:</b> Impregnadas en bioestimulante comercial y regadas con agua salina

Tabla 20: Acrónimos cultivos ensayo de germinación

De cada tipo de cultivo se preparan 4 placas Petri iguales, y en cada una de ellas 12 semillas, por lo que para cada ensayo habrá un total de 48 semillas a estudiar.

Para expresar los resultados obtenidos en este ensayo se recurre al cálculo de índices de germinación, que permite la estimación y comparación cuantitativa de diferentes muestras sometidas a diferentes tratamientos. Los índices empleados son:

#### 4.2.5.1. Capacidad de germinación

Es el porcentaje de germinación máximo obtenido de cada uno de los ensayos, es decir, de los 4 realizados en las mismas condiciones, en un mismo lote. Se calcula con la emergencia acumulada, esto es la suma del número de semillas que han germinado en un ensayo a cada día que se realiza el recuento; este valor se debe dividir entre el número de semillas que contiene cada placa, ósea 12 semillas, y multiplicar por 100 para obtener el porcentaje deseado. Los valores obtenidos se muestran a continuación.

Ecuación 16: Capacidad de germinación (%)

$$\text{Capacidad de germinación (\%)} = \frac{N_f}{N} \cdot 100$$

Donde:

- $N_f$ : Número de semillas germinadas al final del ensayo
- $N$ : Número de semillas al inicio del ensayo

En la **Tabla 21** se muestran los resultados del lote de Control (C), semillas que han sido impregnadas de agua destilada y regadas también con este tipo de agua.

<b>Capacidad de germinación (%)</b>				
<b>Tiempo</b>	<b>24 h</b>	<b>48 h</b>	<b>96 h</b>	<b>144 h</b>
<b>C1</b>	8,33	25,00	108,33	208,33
<b>C2</b>	8,33	58,33	158,33	258,33
<b>C3</b>	16,67	33,33	116,67	216,67
<b>C4</b>	16,67	25,00	125,00	225,00

Tabla 21: Capacidad de germinación Control

La **Tabla 22** son los valores del lote de Alperujo (A), este ensayo ha sido impregnado en el extracto de alperujo diluido 1:100, y regado con agua destilada.

Capacidad de germinación (%)				
Tiempo	24 h	48 h	96 h	144 h
A1	50,00	66,67	166,67	266,67
A2	41,67	66,67	158,33	250,00
A3	16,67	58,33	150,00	250,00
A4	16,67	41,67	141,67	241,67

Tabla 22: Capacidad de germinación Alperujo

En la **Tabla 23** se muestran los valores del lote de Comercial (CO), este ensayo ha sido impregnado en un bioestimulante comercial y diluido 1:40, y regado con agua destilada.

Capacidad de germinación (%)				
Tiempo	24 h	48 h	96 h	144 h
CO1	50,00	100,00	191,67	283,33
CO2	33,33	50,00	150,00	250,00
CO3	41,67	83,33	183,33	283,33
CO4	41,67	66,67	166,67	266,67

Tabla 23: Capacidad de germinación Comercial

La **Tabla 24** son los valores del lote de Control Salino (CS), es decir, este ensayo ha sido impregnado en agua salina elaborada en el laboratorio, y regado con la misma agua.

Capacidad de germinación (%)				
Tiempo	24 h	48 h	96 h	144 h
CS1	0,00	0,00	16,67	116,67
CS2	8,33	8,33	50,00	141,67
CS3	25,00	33,33	58,33	158,33
CS4	41,67	41,67	58,33	133,33

Tabla 24: Capacidad de germinación Control Salino

En la **Tabla 23** se muestran los valores del lote de Alperujo Salino (AS), este ensayo ha sido impregnado en una dilución 1:100 del extracto de alperujo y regado con agua salina.

Capacidad de germinación (%)				
Tiempo	24 h	48 h	96 h	144 h
AS1	33,33	33,33	33,33	125,00
AS2	16,67	16,67	25,00	125,00
AS3	16,67	16,67	25,00	125,00
AS4	33,33	33,33	50,00	141,67

Tabla 25: Capacidad de germinación Alperujo Salino

La **Tabla 24** son los valores del lote de Comercial Salino (COS), este ensayo ha sido impregnado en un bioestimulante comercial y diluido 1:40, y regado con agua salina elaborada en el laboratorio.

Capacidad de germinación (%)				
Tiempo	24 h	48 h	96 h	144 h
COS1	0,00	0,00	16,67	100,00
COS2	50,00	50,00	58,33	158,33

<b>COS3</b>	41,67	50,00	75,00	158,33
<b>COS4</b>	25,00	33,33	50,00	150,00

Tabla 26: Capacidad de germinación Comercial Salino

Al observar los resultados finales de los cultivos ensayados con agua destilada, es decir, los resultados de las **Tabla 21, Tabla 22 y Tabla 23**, a las 144 horas, ya que es el último día del ensayo, se observan diferencias significativas entre las semillas impregnadas en agua destilada, las impregnadas en alperujo y las comerciales.

En cuanto a los cultivos ensayados con agua salina, las **Tabla 24, Tabla 25 y Tabla 26**, a las 144 horas, no se observan diferencias significativas, ya que todos los cultivos presentan resultados muy similares de capacidad de germinación.

También se observan diferencias entre los ensayos salinos y los normales, pues el objetivo del riego salino es someter los cultivos a un estrés y como se puede comprobar esto funciona, pues su porcentaje de germinación máximo es menor que el porcentaje de los ensayos regados con agua destilada, ya que los ensayos con riego salino no han sido capaces de superar el estrés al que han sido sometidas sus semillas. Para mostrar visualmente estos resultados se realiza un gráfico, calculando el promedio de cada ensayo, es decir, de las 4 placas Petri destinadas al mismo sustrato; este paso se realiza en cada ensayo y a cada tiempo de germinación, obteniendo el gráfico de barras de la **Figura 49** donde se observa la diferencia entre los ensayos de riego con agua destilado y los de riego con agua salada, mostrándose también la evolución germinativa de los diferentes ensayos a lo largo del tiempo.

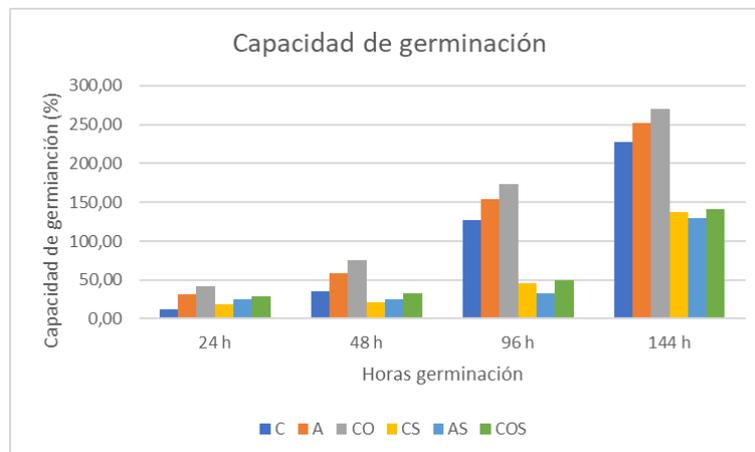


Figura 49: Gráfico de barras capacidad de germinación

Gracias a este gráfico se puede ver visualmente como existe una diferencia entre la capacidad germinativa de las semillas de control (C) y las semillas de alperujo (A) y las de bioestimulante comercial (CO). Por lo que se procede al cálculo del porcentaje de mejora entre las semillas impregnadas en agua destilada y las impregnadas en alperujo y en bioestimulante comercial para comprobar numéricamente cuanto mejora la germinación de las semillas los distintos sustratos.

Cultivo	Promedio capacidad de germinación (%) 144 h	Porcentaje de mejora (%)
C	227.08	0
A	252.08	25
CO	270.83	43.75

Tabla 27: Porcentaje de mejora capacidad de germinación 144h

Por lo que las semillas impregnadas en alperujo respecto a las impregnadas en agua destilada presentan una mejora en su capacidad germinativa del 25 %, es decir, una mejora significativa para tratarse de extractos los cuales no han pasado por un proceso de limpieza y de membranas como es el caso de los extractos comerciales. El porcentaje de mejora de las semillas impregnadas en bioestimulante comercial respecto a las impregnadas en agua destilada es del 43.75 %, casi una mejora del 50 % ya que se trata de un bioestimulante comercializado vendido con el objetivo de mejorar los cultivos. La diferencia entre el porcentaje de mejora del ensayo comercial y el del alperujo extraído es del 18.75 % valor muy reducido para tratarse de un extracto que no se le ha realizado la purificación, por lo que se puede determinar que el alperujo muestra buenas capacidades germinativas.

Para poder observar la curva de germinación y así ver visualmente cuál de los ensayos presenta un menor período de latencia se elabora el gráfico de dispersión mostrado en la **Figura 50**. Donde se observa que el ensayo que mejor funciona es el impregnado en el bioestimulante comercial y regado con agua destilada, puesto que muestra una curva de ascenso a menor tiempo de ensayo que el resto de las rectas y también se corresponde con la recta que mayor capacidad de germinación (%) alcanza, ya que es la que asciende. Este gráfico confirma nuevamente que entre los resultados germinativos de las semillas impregnadas en alperujo y las de bioestimulante comercial existe una capacidad germinativa

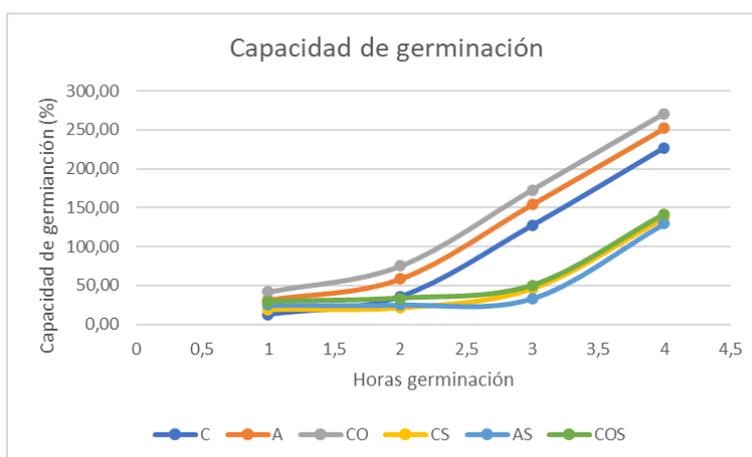


Figura 50: Gráfico de dispersión capacidad de germinación

#### 4.2.5.2. Velocidad de germinación ( $V_g$ )

Se trata del tiempo que necesitan las semillas para llevar a cabo la germinación. Se calcula mediante el coeficiente de germinación, este se define por la siguiente ecuación:

$$V_g = \frac{\sum N_i}{\sum N_i \cdot D_i} \cdot 100$$

Donde:

- $N_i$ : Número de semillas germinadas el día  $D_i$
- $D_i$ : Número de días desde la siembra hasta la germinación

Este coeficiente aumenta cuando el número de semillas germinadas aumenta y el tiempo para la germinación disminuye. No está relacionado con la capacidad de germinación, ya que este coeficiente será del 100 % si todas las semillas germinan el primer día.

Los resultados del ensayo de germinación en el lote de control se muestran en la **Tabla 28**. Se observa que los valores están entre el 30- 32 %, sin ser ninguno 100% ya que no germinan todas las semillas el primer día, sino que se trata de un crecimiento más progresivo.

<b>Coeficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>C1</b>	30,12
<b>C2</b>	31,96
<b>C3</b>	30,95
<b>C4</b>	30,68

Tabla 28:  $V_g$  (%) Control

En la siguiente tabla se muestra el coeficiente del ensayo bañado en alperujo y regado con agua destilada, sus valores son similares a los del ensayo de control.

<b>Coeficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>A1</b>	34,04
<b>A2</b>	34,09
<b>A3</b>	32,26
<b>A4</b>	31,52

Tabla 29:  $V_g$  (%) Alperujo

En la **Tabla 30** se muestran los resultados del ensayo realizado con un bioestimulante comercial, como se puede observar su porcentaje es algo mayor que en el ensayo control, pero a gran escala supone una diferencia insignificante.

Por lo que se determina que no hay diferencia significativa entre los ensayos realizados con semillas impregnadas en agua destilada, en alperujo de las extracciones o en un bioestimulante comercial, ya que los porcentajes de los coeficientes de velocidad son todos similares entre sí.

<b>Coeficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>CO1</b>	35,79

<b>CO2</b>	32,61
<b>CO3</b>	34,34
<b>CO4</b>	33,68

Tabla 30: Vg (%) Comercial

Los resultados del ensayo de las semillas en agua salina, control salino, se muestran en la **Tabla 31**, tiene unos porcentajes más distantes entre sí, ya que varía entre el 28 % y el 35 %, pero esto se debe a que entre un ensayo y otro las semillas han experimentado tiempos distintos de latencia.

Al comparar el control salino con el control de la **Tabla 28**, se observa como apenas se aprecia diferencia entre el riego salino y el riego con agua destilada.

<b>Coefficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>CS1</b>	35,00
<b>CS2</b>	28,33
<b>CS3</b>	30,65
<b>CS4</b>	34,04

Tabla 31: Vg (%) Control Salino

En esta tabla se muestran los valores del ensayo realizado en alperujo salino, es decir, con extracto de alperujo como sustrato para bañar las semillas y con un riego de agua salina. Las diferencias de este ensayo con el de control salino no son apreciables; al compararse con el ensayo que emplea un riego de agua destilada se observa que los valores de la **Tabla 29** son superiores, pero no es una diferencia notable.

<b>Coefficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>AS1</b>	31,25
<b>AS2</b>	28,30
<b>AS3</b>	28,30
<b>AS4</b>	31,48

Tabla 32: Vg (%) Alperujo Salino

En esta última tabla de resultados, **Tabla 33**, se muestra el ensayo en comercial salino, este presenta porcentajes algo mayores que los otros dos ensayos en riego salino, pero realmente son resultados poco significativos, pues comparados con el 100 % son minúsculos.

Al comparar este ensayo con el de comercial de riego con agua destilada, **Tabla 30**, los porcentajes mostrados son muy similares, por lo tanto, hay una mínima diferencia entre un ensayo y otro.

<b>Coefficiente velocidad de germinación (%)</b>	
<b>COS1</b>	35,29
<b>COS2</b>	33,33
<b>COS3</b>	33,93

<b>COS4</b>	<b>30,51</b>
-------------	--------------

Tabla 33: Vg (%) Comercial Salino

En definitiva, la velocidad de germinación no varía notablemente entre unos ensayos y otros, no existiendo diferencia notable entre los ensayos de agua destilada y los de agua salina, ni entre los lotes impregnados en alperujo y en bioestimulante comercial.

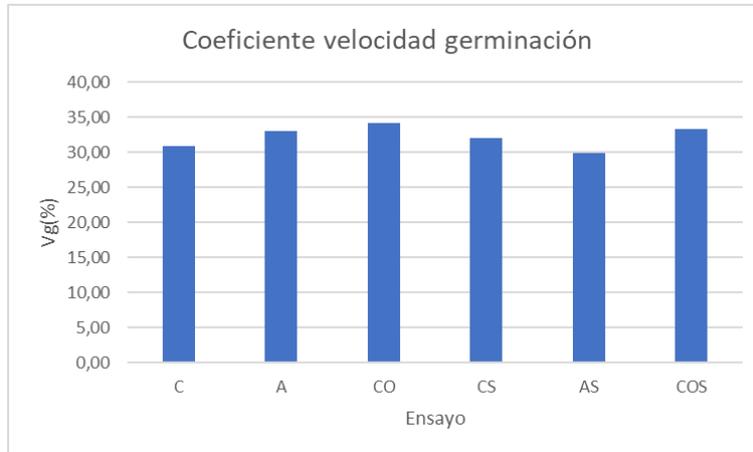


Figura 51: Gráfico de barras coeficiente de velocidad de germinación (Vg%)

Para poder apreciar mejor la velocidad de germinación de cada ensayo se calcula un valor medio de cada uno de ellos y se comparan entre ellos, se puede observar en este gráfico de barras que el ensayo que presenta mayor velocidad de germinación es el impregnado por un bioestimulante comercial y después regado con agua destilada, sin someterse a un escenario de estrés. El ensayo que peor funciona es el del alperujo salino (AS), este presenta el porcentaje de velocidad de germinación más bajo; pero si se observa el eje de las ordenadas se ve como realmente el cambio es de un 5 % por lo que es una variación casi insignificante.

Para apreciar mejor la variación se realiza el mismo gráfico, pero con valores relativos, es decir, el ensayo con bioestimulante comercial al presentar el valor más elevado se toma como el 100 %. Gracias a esta nueva representación se puede apreciar como la velocidad de germinación sí que varía entre unos ensayos y otros, pues se puede ver como el ensayo que peor coeficiente presenta es el de alperujo salino (AS), pues tiene una reducción del 12.5 %; mientras que el ensayo con bioestimulante comercial tanto de riego salino como de normal presentan un coeficiente muy similar, diferenciándose por el 2.5 %. Gracias a este ensayo también se observa que el ensayo realizado con alperujo varía un 3.3 % respecto del comercial, por lo que para estar realizado con extractos que no han tenido una purificación es un valor poco inferior, con lo que el alperujo se puede considerar un buen bioestimulante comercial.

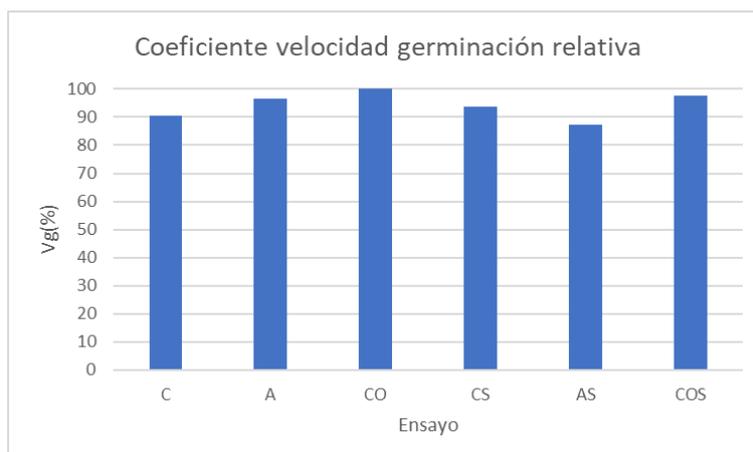


Figura 52: Gráfico de barras coeficiente velocidad de germinación relativa (Vg%)

#### 4.2.5.3. Índice Timpson (It)

Este índice tiene en cuenta tanto el porcentaje de germinación como la velocidad de germinación, es decir, el número de semillas que germinan y el tiempo que tardan en hacerlo; se calcula mediante la siguiente ecuación:

Ecuación 18: Índice Timpson (It)

$$I_T = \sum N_i \cdot (T - J_i)$$

$$J_i = D_i - 1$$

Donde:

- $N_i$ : Número de semillas germinadas el día  $D_i$
- $T$ : Número del último día de conteo desde la siembra
- $J_i$ : Número de días desde la siembra hasta la germinación

El índice de Timpson aumenta cuando aumenta el número de semillas germinadas ( $N_i$ ), por lo que, su valor depende de la capacidad de germinación, aumentando con la velocidad de germinación ya que cuanto antes germinen las semillas mayor será  $T$  y mayor el producto  $N_i(T-J_i)$ .

En la **Tabla 34** se muestran los valores del índice de Timpson del ensayo control, es decir, el realizado con agua destilada. Dentro de este ensayo la placa que mejores resultados proporciona es la C4 pues su valor es mayor y esto quiere decir que un mayor número de semillas han germinado en un menor tiempo.

Índice Timpson	
<b>C1</b>	42,00
<b>C2</b>	58,00
<b>C3</b>	46,00
<b>C4</b>	47,00

Tabla 34: Índice Timpson Control

En la siguiente tabla los valores que se muestran son los del ensayo con alperujo y regado con agua destilada, estos presentan unos valores más altos que el ensayo anterior, lo que significa que mediante este método se obtienen mejores resultados y en más corto tiempo que en las condiciones anteriores.

<b>Índice Timpson</b>	
<b>A1</b>	66,00
<b>A2</b>	62,00
<b>A3</b>	57,00
<b>A4</b>	53,00

*Tabla 35: Índice Timpson Alperujo*

En el ensayo comercial, **Tabla 36**, en índice Timpson aumenta en comparación con los otros dos ensayos realizados con riego con agua destilada, por lo que es el que mejores resultados da en cuanto ha germinación y velocidad de esta.

<b>Índice Timpson</b>	
<b>CO1</b>	75,00
<b>CO2</b>	58,00
<b>CO3</b>	71,00
<b>CO4</b>	65,00

*Tabla 36: Índice Timpson Comercial*

En la **Tabla 37**, se muestran los valores del ensayo control salino, por lo tanto, el de riego con agua salina. Este ensayo presenta resultados de peor valor que los anteriores, los regados con agua destilada.

<b>Índice Timpson</b>	
<b>CS1</b>	16,00
<b>CS2</b>	25,00
<b>CS3</b>	33,00
<b>CS4</b>	33,00

*Tabla 37: Índice Timpson Control Salino*

En la siguiente tabla se muestran los valores del ensayo realizado con alperujo salino, como se puede observar al comparar estos valores con el resto de las tablas tanto de riego normal como de riego salino, este ensayo es el que peores resultados muestra, siendo muy próximo a los resultados del ensayo de control salino, **Tabla 37**.

<b>Índice Timpson</b>	
<b>AS1</b>	27,00
<b>AS2</b>	22,00
<b>AS3</b>	22,00
<b>AS4</b>	31,00

*Tabla 38: Índice Timpson Alperujo Salino*

En la **Tabla 39** se muestran los resultados del índice de Timpson del ensayo realizado con bioestimulante comercial y de riego salino, este presenta valores pocos diferenciados del resto de ensayos de riego salino, esto se debe a que el riego salino se utiliza para crear una situación de estrés a las semillas y observar cómo reaccionan, como se ha podido ver este tipo de riego no es el óptimo para el crecimiento de las semillas.

Índice Timpson	
<b>COS1</b>	14,00
<b>COS2</b>	38,00
<b>COS3</b>	39,00
<b>COS4</b>	31,00

Tabla 39: Índice Timpson Comercial Salino

Como se ha mencionado en la explicación de este índice, este aumenta cuando el número de semillas germinadas es mayor, pero también depende de la velocidad de germinación de estas; por ellos este índice tiene en cuenta ambos valores y se puede observar en la **Figura 53** que el ensayo que mejor resultados da de estos dos ensayos es el ensayo comercial (CO), en el que se han impregnado las semillas con un bioestimulante comercial y después los riegos se han realizado con agua destilada. Esto quiero decir que el ensayo de germinación es el que mayor número de semillas germinadas tiene y que además son las que mayor velocidad de germinación tiene, su índice de Timpson tiene el valor de 67.25. El ensayo que peores resultados da es del alperujo salino, pues su índice de Timpson es de 25.5.

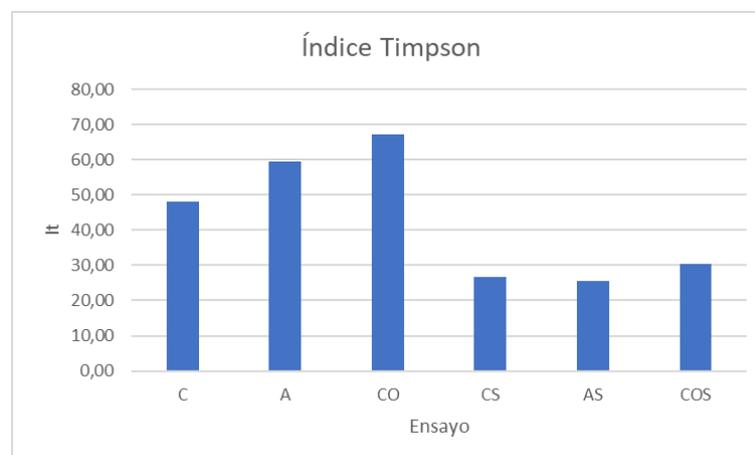


Figura 53: Gráfico de barras Índice Timpson (It)

#### 4.2.5.4. Coeficiente de uniformidad (Cu)

Este coeficiente depende de la duración de los ensayos y no de las disoluciones empleadas en cada uno de los ensayos. Por lo que un ensayo de mayor duración proporciona un mejor coeficiente de uniformidad. Para su cálculo se emplea la siguiente ecuación:

Ecuación 19: Coeficiente de uniformidad (Cu)

$$C_u = \frac{\sum N_i}{\sum N_i \cdot (\bar{D} - D_i)^2}$$

Donde:

- $N_i$ : Número de semillas germinadas el día  $D_i$
- $\bar{D}$ : Número de días después de la siembra
- $D_i$ : Número de días desde la siembra hasta la germinación

Este coeficiente aumenta cuanto más tiempo es necesario para alcanzar la máxima germinación. Por lo tanto, cuanto mayor sea su valor más habrán tardado las semillas en germinar.

En esta primera tabla, **Tabla 40**, se muestra el valor del coeficiente de uniformidad del ensayo control, el valor más elevado se debe a que en los primeros muestreos muy pocas de las semillas han germinado, siendo ya en los últimos días del ensayo cuando germinan todas.

Coeficiente de uniformidad	
<b>C1</b>	0,926
<b>C2</b>	0,689
<b>C3</b>	0,722
<b>C4</b>	0,794

Tabla 40: Coeficiente de uniformidad Control

La **Tabla 41** hace referencia al ensayo con alperujo, este ensayo presenta unos tiempos de germinación lineales, por ello sus valores de coeficiente no son elevados.

Coeficiente de uniformidad	
<b>A1</b>	0,432
<b>A2</b>	0,441
<b>A3</b>	0,612
<b>A4</b>	0,690

Tabla 41: Coeficiente de uniformidad Alperujo

En la **Tabla 42**, ensayo comercial con un bioestimulante comercial, sucede parecido al ensayo anterior, donde los resultados no tienen valores elevados debido a que la germinación de las semillas sucede paulatinamente.

Coeficiente de uniformidad	
<b>CO1</b>	0,382
<b>CO2</b>	0,536
<b>CO3</b>	0,442
<b>CO4</b>	0,464

Tabla 42: Coeficiente de uniformidad Comercial

La **Tabla 43** es la del ensayo de control salino, donde el riego se realiza con agua salina; el elevado valor de 7 como coeficiente de uniformidad se debe a que las semillas presentan más de un día de latencia, no siendo hasta los dos últimos días del ensayo su germinación; por lo que en los primeros muestreos el valor de semillas germinadas equivale a 0.

<b>Coefficiente de uniformidad</b>	
<b>CS1</b>	7,000
<b>CS2</b>	1,214
<b>CS3</b>	0,559
<b>CS4</b>	0,340

Tabla 43: Coeficiente de uniformidad Control Salino

En la **Tabla 44**, ensayo alperujo salino, la germinación también resulta uniforme y por ello los valores no son elevados.

<b>Coefficiente de uniformidad</b>	
<b>AS1</b>	0,417
<b>AS2</b>	0,789
<b>AS3</b>	0,789
<b>AS4</b>	0,447

Tabla 44: Coeficiente de uniformidad Alperujo Salino

En cuento a la **Tabla 45** se trata de los valores del ensayo comercial salino, donde se observa nuevamente un valor muy elevado en el coeficiente de uniformidad, 6 Cu, este elevado valor se debe a la misma que causa que anteriormente, el tiempo de latencia supera el primer día y no es hasta los dos últimos días de tomar medidas que sus semillas no han germinado.

<b>Coefficiente de uniformidad</b>	
<b>COS1</b>	6,000
<b>COS2</b>	0,345
<b>COS3</b>	0,365
<b>COS4</b>	0,545

Tabla 45: Coeficiente de uniformidad Comercial Salino

A mayor tiempo necesario para alcanzar la germinación de las 12 semillas de cada ensayo mayor es el valor del coeficiente de uniformidad, por lo tanto, en el gráfico mostrado en la **Figura 54** aquellas barras que sean más próximas al valor máximo del eje de las ordenadas quiere decir que necesitan mayor tiempo para conseguir la germinación de todas sus semillas. Por lo que las semillas que peor coeficiente de uniformidad presentan son las del ensayo control salino; aunque anteriormente se ha comentado que este índice no depende del sustrato empleado sino del tiempo necesario para la germinación total, al ser el tiempo del ensayo el mismo para todos los casos se desea estudiar cuál de los sustratos necesitarían de un mayor tiempo de ensayo para la germinación total de sus semillas, concluyendo que sería el sustrato de agua salina y regado con este mismo.

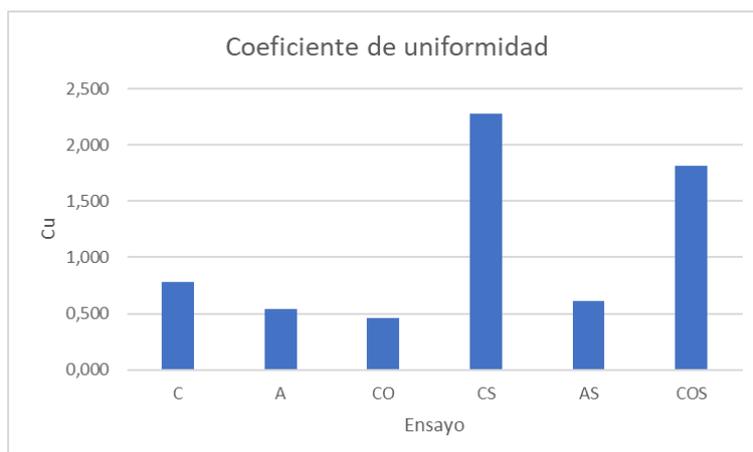


Figura 54: Gráfico de barras Coeficiente de uniformidad (Cu)

El análisis de estos índices permite estudiar el efecto de cada uno de los sustratos empleados para la germinación de las raíces y así comparar sus resultados para poder determinar si el efecto del residuo del alperujo es óptimo para este uso. Al realizar los diversos estudios se ha observado que no existen diferencias significativas entre unos sustratos y otros, pues los ensayos de control, el de alperujo y el del comercial proporcionan datos similares y poco diferenciados; lo mismo sucede al comparar los ensayos de tipo salino, donde todos los sustratos actúan también de forma similar. Si que se observan diferencias significativas al comparar los ensayos de tipo normal y los de tipo salino, pues los salinos dan resultados menos óptimos debido al estrés al que se someten las semillas.

Los posibles motivos por los que estos ensayos no han proporcionado datos correctos podrían ser por una mala impregnación de las semillas en los sustratos o por no haber realizado una diálisis previa al extracto, esto es, una limpieza de sus impurezas tóxicas.

## 5. Escalado industrial

La parte del escalado industrial supone una fase crítica ya que se pasa de una escala de laboratorio donde todo es a pequeña escala, a una gran escala donde la producción a nivel industrial es posible; esta parte determina si es viable el proceso de desarrollo de este nuevo producto. En este proyecto para realizar el escalado industrial se van a escalar las condiciones a pH 13, pues se ha demostrado que es el pH que mejores condiciones presenta para la extracción de sustancias húmicas.

El primer paso para comenzar los cálculos a escala industrial es determinar una base de cálculo, esto es, conocer la masa con la que se va a trabajar, en la Comunidad Valenciana, zona en la que 93492 hectáreas son destinadas a la producción de aceite de oliva por lo que se producirán elevadas toneladas de residuo de alperujo. Pero la base de cálculo que se estima debe ser una fracción de esta producción para así asegurarse que será una masa manejable para la planta industrial que se desea montar, por lo que, se estima una base de cálculo de 30000 kilogramos en los meses en los que los olivos dan producción y entonces esta se recoge y se lleva a las almazaras para producir el aceite; los meses en los que se trabaja con este residuo son 4, noviembre, diciembre, enero y febrero, meses en los que la recogida de la oliva se realiza. En estos 4 meses se trabajan un total de 80 días, trabajando de lunes a viernes en un horario de 16 horas, que será un turno de 8 horas de mañana y otro del mismo tiempo de tarde, y respetando festivos tanto nacionales como de la Comunidad Valenciana ya que para la elaboración de esta parte se ha buscado el calendario de festivos del año 2023.

Por lo que:

*Ecuación 20: Horas laborales en 4 meses*

$$\text{Horas laborales} = 80 \text{ días de trabajo} \cdot 16 \frac{\text{horas}}{\text{día}} = 1280 \text{ h de trabajo en 4 meses}$$

Tener en cuenta que los cálculos realizados serán a 4 meses de trabajo, pues son los meses de la producción de aceite de oliva, pero la planta que se está diseñando el resto de las temporadas se mantendrá activa gracias a otro tipo de residuos orgánicos como es la vid.

Ahora es necesario conocer la cantidad de extracto que se podrá extraer al día con los 30000 kg de residuo, para ello se deben tomar las medidas utilizadas a pequeña escala en el laboratorio y escalarlas a gran tamaño. En el laboratorio se emplean 0.125 kg de residuo con 0.5 L de agua destilada y una cantidad de 3.3 gramos de hidróxido de potasio, según se ha visto en el apartado **Preparación extracciones**, en estas condiciones el volumen de extracto varía entre 100/ 200 mL, para los cálculos se emplea el volumen de mayor extracción para así asegurarse que la planta podrá trabajar en sus condiciones de máximo trabajo, sabiendo que en menores volúmenes podrá trabajar igual. Para el paso a escala industrial primero se define

el factor de escalado, que consiste en conociendo la masa que se trata en el laboratorio se relaciona para obtener la masa que se debe utilizar a escala industrial.

*Ecuación 21: Factor de escalado*

$$\text{Residuo}_L = 0.125 \text{ kg de residuo en el laboratorio}$$

$$\text{Residuo}_I = 30000 \text{ kg de residuo en la industria}$$

$$\text{Residuo}_I = k \cdot \text{Residuo}_L$$

$$30000 \text{ kg} = k \cdot 0.125 \text{ kg} \rightarrow k = 240000$$

Gracias al factor de escalado se pueden realizar los cálculos a escala industrial de forma fácil. Para conocer la cantidad de agua necesaria en planta se sigue el mismo modelo de ecuación.

*Ecuación 22: Volumen agua en escala industrial*

$$\text{Agua}_L = 0.5 \text{ L de agua en el laboratorio}$$

$$\text{Agua}_I = k \cdot \text{Agua}_L \rightarrow \text{Agua}_I = 240000 \cdot 0.5 \text{ L} \rightarrow$$

$$\text{Agua}_I = 120000 \text{ L de agua a escala industrial}$$

Una vez calculada la cantidad de agua se define la cantidad de hidróxido de potasio necesario, el utilizado al igual que en el laboratorio tendrá una pureza del 85 %, como se mostraba en la **Tabla 1**.

*Ecuación 23: Masa KOH en escala industrial*

$$\text{KOH}_L = 0.0033 \text{ kg}$$

$$\text{KOH}_I = k \cdot \text{KOH}_L \rightarrow \text{KOH}_I = 240000 \cdot 0.0033 \text{ kg} \rightarrow$$

$$\text{KOH}_I = 792 \text{ kg KOH al 85\% a escala industrial}$$

Conocida ya la cantidad de residuo, agua e hidróxido de potasio necesaria para realizar las extracciones se calcula el volumen de extracto que se obtendría, para ello se emplea nuevamente el factor de escalado.

*Ecuación 24: Volumen extracto en escala industrial*

$$\text{Extracción}_L = 0.2 \text{ L}$$

$$\text{Extracción}_I = k \cdot \text{Extracción}_L \rightarrow \text{Extracción}_I = 240000 \cdot 0.2 \rightarrow$$

$$\text{Extracción}_I = 48000 \text{ L de extracto a pH 13 a escala industrial}$$

Con este cálculo se conoce que el volumen que se va a poder extraer con los 30000 kg de residuo es de 48000 L de extracto, esta cantidad se debe extraer en un tiempo de 4 meses, con sus respectivos 80 días laborales, por lo que se debe calcular la cantidad de extracto al

día para así poder determinar el volumen del reactor o reactores que se debe utilizar en la planta.

La cantidad de extracto que se obtendrá al día es de:

*Ecuación 25: Volumen extracción al día en escala industrial*

$$\text{Extracto al día}_I = \frac{\text{Extracción}_I}{\text{Días de trabajo}} \rightarrow$$

$$\text{Extracto al día}_I = \frac{48000L}{80 \text{ días}} = 600 \text{ L de extracto al día}$$

*Ecuación 26: Volumen extracción a la hora en escala industrial*

$$\text{Extracto a la hora}_I = \frac{\text{Extracto al día}_I}{\text{Horas de trabajo al día}} = \frac{600L}{16h} = 37.5 \text{ L de extracto a la hora}$$

Para poder trabajar con los 30000 kg de residuo de alperujo proporcionados se deben realizar extracciones de 600 L al día, es decir, 37.5 L de extracto cada hora que la fábrica esta activa. Para este volumen de trabajo al día se debe calcular la cantidad de residuo, de agua y de hidróxido de potasio a emplear.

El residuo de alperujo necesario para una producción al día de 600 L es de 375 kg.

*Ecuación 27: Masa residuo al día en escala industrial*

$$\text{Residuo al día}_I = \frac{\text{Residuo}_I \cdot \text{Extracto al día}_I}{\text{Extracción}_I} \rightarrow$$

$$\text{Residuo al día}_I = \frac{30000kg \cdot 600L}{48000L} = 375 \text{ kg de residuo de alperujo se emplea al día}$$

Para tal masa de residuo se debe calcular la cantidad de agua necesaria, el volumen necesario es de 1500 L de agua destilada al día.

*Ecuación 28: Volumen agua al día en escala industrial*

$$\text{Agua al día}_I = \frac{\text{Agua}_I \cdot \text{Residuo al día}_I}{\text{Residuo}_I} \rightarrow$$

$$\text{Agua al día}_I = \frac{120000L \cdot 375kg}{30000kg} = 1500 \text{ L de agua al día}$$

Y la cantidad de hidróxido de potasio para alcanzar el pH deseado es de 9.9 kg al día.

*Ecuación 29: Masa KOH al día en escala industrial*

$$\text{KOH al día}_I = \frac{\text{KOH}_I \cdot \text{Residuo al día}_I}{\text{Residuo}_I} \rightarrow$$

$$\text{KOH al día}_I = \frac{792kg \cdot 375kg}{30000kg} = 9.9 \text{ kg de KOH al 85 \% se utiliza al día}$$

El reactor se va a utilizar para realizar la digestión del proceso, es decir, la unión del residuo con el agua y el KOH, y se mantendrá en agitación. Esta parte del proceso dura 24 horas, por lo que en el reactor en el que se realice la digestión estará 1 día entero sin poder ser cargado de nuevo ni descargado. Por lo que se ha ideado la utilización de dos reactores, con el propósito de que mientras uno de ellos este en digestión el otro este en descarga para filtrado. El volumen operativo de cada reactor debe ser de 2000 L, ya que se ha calculado que se emplean 1500 L de agua al día, pero a este volumen se le debe agregar las masas del KOH y del residuo y además contar con que el tamaño debe ser algo mayor por seguridad, por lo que se estima que el volumen necesario será de 2000 L por reactor.

La carga del reactor se realiza con una bomba de sólidos por la parte superior del reactor para el caso de los residuos de alperujo y de la alimentación del hidróxido de potasio, esta bomba se conecta al reactor y mediante un juego de abrazaderas se puede cambiar del depósito donde se almacena el alperujo al que se almacena el KOH para que con una misma bomba poder cargar el reactor; el llenado de agua se realiza mediante una válvula de llenado. Una vez este todo en el reactor mediante un agitador de tipo combinado, turbina y hélice, se escoge este tipo de mezclador debido a que se trata de un gran volumen con una alta viscosidad, debido a la mezcla del agua con el residuo, así se asegura una correcta homogeneidad entre los reactivos. Pasadas las 24 horas de digestión se comienza el filtrado, para ello se emplea una bomba para fluidos viscosos conectada a un filtro de vacío, tener en cuenta que el filtro se colmata haciendo que el rendimiento de la producción disminuya, por lo que cada 2 horas se debe cambiar este filtro, este proceso se estima que dura 30 min; por lo que si cada 2 horas se debe detener el filtrado durante 30 min, el tiempo de filtrado en las 16 horas de trabajo se reduce a 12 horas de trabajo de filtrado, por lo que a la hora se debe filtrar un total de 125 litros de extracto.

*Ecuación 30: Horas de filtrado*

$$\text{Paradas al día} = \frac{16 \text{ horas de trabajo}}{\text{Cada 2 horas parada}} = 8 \text{ paradas al día}$$

$$\text{Tiempo producción parada} = 8 \text{ paradas al día} \cdot 30 \text{ min} = 240 \text{ minutos sin filtrar}$$

$$\rightarrow \text{Tiempo producción parada} = 240 \text{ min} \cdot \frac{1 \text{ h}}{60 \text{ min}} = 4 \text{ horas totales}$$

$$\text{Horas de filtrado} = \text{Horas de trabajo} - \text{Tiempo producción parada}$$

$$\rightarrow \text{Horas de filtrado} = 16\text{h} - 4\text{h} = 12 \text{ horas de trabajo de filtrado}$$

*Ecuación 31: Volumen filtrado al día*

$$\text{Agua al día}_1 = 1500 \frac{\text{L}}{\text{día}}$$

$$\begin{aligned} \text{Filtrado día}_1 &= \frac{1500 \frac{L}{\text{día}}}{12 \text{ horas de trabajo de filtrado}} \\ &= 125 L \text{ se deben filtrar en 12 horas de trabajo} \end{aligned}$$

Para que tal cantidad de filtrado sea posible se emplea un filtro con un vaso de 140 L, posteriormente de este primer filtrado de gruesos se pasa a un segundo filtrado de finos, para asegurar que el extracto quede lo más filtrado posible. Finalmente, el extracto se deposita para ser almacenado. Cuando el filtrado finaliza se realiza la limpieza del reactor y filtro y es al día siguiente cuando se carga nuevamente para empezar la digestión.

Una vez la extracción ha sido realizada se debe calcular si es viable el envasado de esta para su posterior venta como fertilizante en la agricultura. Para ello se debe buscar información sobre marcas comerciales de bioestimulantes para así conocer el formato de venta de este tipo de sustancias y su modelo de empleo. Eco Cultivers, marca especializada en este tipo de fertilizantes ofrece un abono de ácidos húmicos y fúlvicos en formato líquido, en el que para su empleo se debe diluir 20 mL de su producto en 1 L de agua, la etiqueta del producto comercial se muestra en la **Figura 55**. Donde también se especifica su contenido en extractos húmicos, ácidos húmicos y fúlvicos; y que se trata de un producto 100 % ecológico obtenido de la leonardita que es un fertilizante orgánico.

Con esta información se procede a calcular los mg de carbono que habrá por cada litro de este fertilizante y así poder equiparar estos resultados con los obtenidos de la caracterización de los extractos en el laboratorio. El bioestimulante comercial tiene un contenido en carbono orgánico total de 286700 mg C/ L (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**), por lo que, si para su preparación para poder ser empleado en suelos agrícolas se diluye 20 mL del producto en 1 L de agua, esto quiere decir que por cada litro de mezcla habrá 5734 mg de carbono.

*Ecuación 32: Carbono contenido en 1 L de fertilizante comercial*

$$\frac{mg C}{L \text{ mezcla}} = 0.02 L \text{ (diluido)} \cdot \frac{286700 mg C}{1L} = 5734 \frac{mgC}{L \text{ mezcla}}$$

En el extracto obtenido en el laboratorio a pH 13 su contenido en carbono orgánico total (TOC) es de 21500 mg C/ L (**Tabla 18**), este resultado es superior al que tiene la dilución comercial, por lo que se debe calcular una concentración parecida a la que diluir el extraído en el laboratorio y posteriormente en la planta industrial para poder comercializar los extractos producidos al igual que el bioestimulante con el que se está equiparando. Por lo que con 266.7 mL de extracto en 1 L de agua se podrá obtener una concentración de 5375 mg de carbono en 1 litro de fertilizante.

$$\text{Volumen extracto} = \frac{\frac{\text{mgC}}{\text{L mezcla}} \text{ muestra} \cdot \text{Volumen}}{\frac{\text{mg C}}{\text{L extracto}}} \rightarrow$$

$$\text{Volumen extracto} = \frac{5734 \cdot 1}{21500} = 0.266 \text{ L}$$

Este valor se puede redondear a 270 mL de extracto en 1 L de agua, con lo que el contenido en carbono será de 5805 mg de carbono en 1 litro de fertilizante. Por lo que al tener que usar mayor cantidad para resultados parecidos al fertilizante que ya se encuentra en mercado se deben barajar diversas opciones para que sea viable su venta, como puede ser un coste más reducido, o un tratamiento de membranas, que aumentaría el precio en el proceso de extracción, pero sería posible obtener sustancias húmicas en mayor concentración.



Figura 55: Etiqueta fertilizante comercial<sup>[52]</sup>

## 6. Viabilidad económica

Una vez realizado el escalado se debe calcular el coste estimado que conlleva realizar este proceso en una planta industrial, donde se debe tener en cuenta los materiales, los equipos, las instalaciones, el personal y la energía empleados.

### 6.1. Presupuesto de inversión inicial

En este presupuesto se debe incluir todos aquellos gastos necesarios para poner en funcionamiento un nuevo negocio, en este caso una planta de extracción de sustancias húmicas a partir de residuos de alperujo y su posterior venta como fertilizantes en agricultura; y así asegurarse de que el posible negocio sea viable económicamente.

Primero se debe tener en cuenta la maquinaria e instrumentación necesaria para llevar a cabo el proyecto, como son los dos reactores de tanque agitado, para el proceso de digestión; las dos bombas de sólidos para la carga de los tanques; la bomba para el vaciado de estos; los dos equipos de filtración y los tanques y depósitos para el almacenaje.

La bomba que se conecta al reactor debe ser una bomba de trasiego, pues será como se cargará el reactor del residuo y del hidróxido; esta bomba cuenta con un mecanismo móvil por lo que será posible utilizar la misma bomba para cargar ambos reactores, gracias a un juego de abrazaderas que hará posible el cambio de reactor y de depósito de llenado. Esta maquinaria debe tener la suficiente anchura en sus desembocaduras como para asegurar que los sólidos más gruesos puedan pasar por ellas.

<https://prodelagricola.com/aceite/bombas/3525-bomba-pasta-o-60-t-180-tc2v-zambelli-380-v.html>

<b>Tipo</b>	Bomba de trasiego
<b>Marca</b>	Zambelli
<b>Material</b>	Acero inoxidable 304
<b>Aplicaciones</b>	Líquidos y pastas despalilladas a alto caudal
<b>Caudal máximo (L/min)</b>	200
<b>Consumo energético máximo (KW)</b>	1.85
<b>Velocidad máxima (rpm)</b>	550
<b>Conectores (mm)</b>	50
<b>Presión máxima (bar)</b>	3.5
<b>Precio (€)</b>	1860.79

Tabla 46: Características de la bomba de trasiego



Figura 56: Bomba de trasiego

En cuanto al reactor debe ser un reactor de tanque agitado, debido a que habrá sólidos en suspensión que no se desea que se depositen en el fondo de este; se ha optado por un reactor de tanque agitado de funcionamiento en continuo con una capacidad de 2000 L, fabricado en acero inoxidable, material adecuado para elevados pH como es el caso, ya que se alcanza un valor de pH 13 para la óptima extracción de sustancias húmicas.

[https://es.made-in-china.com/co\\_fsjctmx/product\\_Laboratory-Chemical-Stirrer-Ingredient-Mixer-Xjt-1-5-3-5L-Gold-Leaching-Reactor\\_uogugheneg.html](https://es.made-in-china.com/co_fsjctmx/product_Laboratory-Chemical-Stirrer-Ingredient-Mixer-Xjt-1-5-3-5L-Gold-Leaching-Reactor_uogugheneg.html)

<b>Tipo</b>	Reactor tanque agitado
<b>Marca</b>	JCT
<b>Volumen (L)</b>	2000
<b>Material</b>	Acero inoxidable
<b>Aplicaciones</b>	Líquidos con sólidos en suspensión y fluidos viscosos
<b>Agitador</b>	Espiral
<b>Consumo energético máximo (KW)</b>	5.5
<b>Velocidad de mezclado máxima (rpm)</b>	53
<b>Precio (€)</b>	3143.70
<b>Precio total (€)</b>	6287.40

Tabla 47: Características reactor



Figura 57: Reactor tanque agitado



Figura 58: Agitador en espiral

Para la segunda bomba que se encarga del vaciado del reactor y el paso al filtro se necesita una bomba que trabaje bien con fluidos viscosos y agresivos, por lo que se opta por una bomba de acero inoxidable. Este equipo es el mismo para los dos reactores, por lo que tan solo se necesitará uno, ya que para la descarga del reactor se debe movilizar a un reactor u otro.

[https://www.misterworker.com/es/meclube/bomba-neumatica-de-doble-membrana-mod-food-ss170-en-acero-inoxidable-ss-aisi-316-bolas-en-ss-aisi-316-028-f170-ab1/12585.html?gmc\\_currency=1&gclid=Cj0KCQjw\\_O2IBhCFARIsAB0E8B9DJB7CoVIAwWslz/RhwZTQlmyNVUybOwxqzCMtc07DUK6wZT1t90MaAh\\_BEALw\\_wcB](https://www.misterworker.com/es/meclube/bomba-neumatica-de-doble-membrana-mod-food-ss170-en-acero-inoxidable-ss-aisi-316-bolas-en-ss-aisi-316-028-f170-ab1/12585.html?gmc_currency=1&gclid=Cj0KCQjw_O2IBhCFARIsAB0E8B9DJB7CoVIAwWslz/RhwZTQlmyNVUybOwxqzCMtc07DUK6wZT1t90MaAh_BEALw_wcB)

<b>Tipo</b>	Bomba neumática
<b>Marca</b>	Meclube
<b>Caudal máximo (L/min)</b>	170
<b>Material</b>	Acero inoxidable
<b>Aplicaciones</b>	Para fluidos de alta viscosidad, agresivos o corrosivos; empleada en industria alimentaria o de construcción
<b>Consumo energético máximo (KW)</b>	3.3
<b>Presión máxima (bar)</b>	8.3
<b>Precio (€)</b>	2230

Tabla 48: Características de la bomba neumática



Figura 59: Bomba neumática

Para el filtrado se debe realizar un primer filtrado de gruesos y posteriormente un segundo filtrado de finos, para así asegurar una óptima eliminación de impurezas. Para el filtrado de gruesos se escoge un filtro Nutsche con filtro de borosilicato como se ha ensayado en el laboratorio.

<https://www.directindustry.es/prod/buchiglas-buechi-ag-reactor-systems-and-pilot-p/product-132686-2540952.html>

<b>Tipo</b>	Filtro Nutsche
<b>Marca</b>	Büchiglasuster
<b>Volumen (L)</b>	140
<b>Material</b>	Vidrio borosilicato
<b>Aplicaciones</b>	Industriales, químicas, de depuración y separación
<b>Agitador</b>	Hélice
<b>Tamaño de filtro máximo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	115
<b>Tamaño de filtro mínimo (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	8
<b>Precio (€)</b>	478.21

Tabla 49: Características filtro grueso



Figura 60: Filtro de gruesos

A este primer filtro se le acopla un filtro de finos que tendrá la luz de malla mucho menor, por lo que filtrado será mucho más fino. De este tipo de filtro también se necesita tan solo uno.

<https://szyuka.en.made-in-china.com/product/cElpwzeCkbVd/China-50bar-High-Precision-Stainless-Steel-Material-Solid-Liquid-Air-Filter.html>

<b>Tipo</b>	Filtro alta precisión
<b>Marca</b>	Yuka
<b>Volumen (L)</b>	140
<b>Material</b>	Cartucho
<b>Aplicaciones</b>	Industriales, químicas, de depuración y separación
<b>Tamaño de filtro máximo (µm)</b>	5
<b>Tamaño de filtro mínimo (µm)</b>	0.01
<b>Caudal (L/ min)</b>	500
<b>Precio (€)</b>	704.25

Tabla 50: Características filtro finos



Figura 61: Filtro finos

Para el almacén de los reactivos y del posterior producto se necesitan 3 depósitos. De extracto al día se obtiene un volumen de 600 litros por lo que el depósito empleado será de 1000 L, para asegurarse un margen de error y que sea posible el almacenaje en este.

[https://www.auer-packaging.com/es/es/Contenedor-IBC-con-palet-de-pl%C3%A1stico/IBC-1000-K-150.50-UN.html?customer\\_type=private&gad=1&gclid=Cj0KCQjwwvilBhCFARIsADvYi7IQqA8Rv3C62oJrOJee2NobppBJOEGlcXb\\_ddbAtjDL3TfG79LtUHQaAnaIEALw\\_wcB](https://www.auer-packaging.com/es/es/Contenedor-IBC-con-palet-de-pl%C3%A1stico/IBC-1000-K-150.50-UN.html?customer_type=private&gad=1&gclid=Cj0KCQjwwvilBhCFARIsADvYi7IQqA8Rv3C62oJrOJee2NobppBJOEGlcXb_ddbAtjDL3TfG79LtUHQaAnaIEALw_wcB)

<b>Tipo</b>	Contenedor con palet de plástico
<b>Marca</b>	AuerPackaging
<b>Volumen (L)</b>	1000
<b>Material</b>	HD- PE
<b>Aplicaciones</b>	Transporte y almacenaje para todo tipo de líquidos
<b>Orificio de llenado (NW)</b>	150
<b>Precio (€)</b>	436.81
<b>Precio total (€)</b>	873.62

Tabla 51: Características contenedor 1000L



Figura 62: Contendor 1000L

### 6.1.1. Gasto de inversión

Producto	Importe (€)	Unidades
Bomba de trasiego	1860.79	1
Reactores tanque agitado	3143.70	2
Bomba neumática	2230	1
Filtro de gruesos	478.21	1
Filtro de finos	704.25	1
Contenedores	436.81	2
<b>Total</b>	<b>12434.27</b>	

Tabla 52: Gastos inversión inicial

Para el cálculo del gasto de inversión se debe tener en cuenta la vida útil de la planta, por lo que se supone que la vida útil será de 10 años, para el cálculo se emplea la siguiente ecuación.

Ecuación 34: Gasto de inversión

$$GI = \frac{I}{U}$$

Donde:

- GI: Gasto de inversión (€/año)
- I: Inversión inicial (€)
- U: Vida útil de la planta (años)

Por lo tanto:

$$GI = \frac{12434.27}{10} \rightarrow GI = 1243.43 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

El valor de gasto de inversión que se debe realizar para poner en marcha la planta en un inicio es de 1243.43 € al año.

## 6.2. Presupuesto de explotación

Para el cálculo del presupuesto de explotación se debe tener en cuenta una previsión económica de la planta, es decir, estimar cuanto sería el gasto del funcionamiento del reactor, de las bombas y de los filtros. Recordando que se trata de una estimación pues los gastos reales no se conocen con exactitud hasta que la planta se pone en marcha.

### 6.2.1. Costes fijos

Los costes fijos son aquellos que no dependen del nivel de actividad de la planta, ya que la planta este produciendo o no se deben contar, ya que permanecen constantes. Estos son los costes de personal, las amortizaciones y los costes del mantenimiento de la planta.

#### 6.2.1.1. Costes de personal

Son los gastos dirigidos a la contratación del personal necesario para que la planta funcione, aquí se tiene en cuenta el tiempo que dedica el personal a las funciones de la planta. Estas funciones serán la carga y descarga de los reactores, su limpieza, el cambio de filtros y la comprobación de que todo funcione correctamente, además de la toma de muestras que se llevaran a un órgano externo para realizarles ensayos de TOC y DQO para comprobar que las extracciones están siendo correctas, estos gastos extras no se tendrán en cuenta en este presupuesto. Se estima que con un operario que trabaje el turno de mañanas y otro el turno de tarde será suficiente, pues la maquinaria una vez cargada tan solo necesita de comprobaciones de correcto funcionamiento y cambio de filtro cada 2 horas, por lo que las horas de trabajo de cada uno de estos operarios será de 8 horas al día de lunes a viernes.

Para conocer el salario de estos operarios se recurre al Boletín Oficial del Estado (BOE), a la última resolución dirigida al salario, esta es la resolución del 16 de enero de 2023 de la Dirección General de Trabajo, donde se registra y publica el acuerdo de las revisiones de las tablas salariales con respecto al año 2022 del convenio colectivo del personal laboral del Consejo de Administración del Patrimonio Cultural; donde se establece que el salario en base bruto mínimo para un técnico de laboratorio ha de ser de 17511.96 €/ año.

Una vez conocido este valor se deben tener en cuenta otros aspectos antes de la contratación de empleados, para así poder estimar correctamente el coste total de la contratación de empleados para la planta. Estos gastos extras son:

- Contingencias comunes: 23.60 % del salario base
- Capacitación y formación profesional: 0.7 % del salario base
- Pagas extras: 2918.66 €/ año al tratarse de técnicos de laboratorio pertenecientes al grupo 3- B y nivel retributivo 4

- Fondo de Garantía Social: 0.20 % del salario base
- Tipo general de desempleo: Contrato indefinido 5.5 % del salario base

Por lo que para conocer el coste total de la contratación de un empleado se debe calcular el coste de la seguridad social con los porcentajes previamente mencionados, siendo el coste por trabajador total de 25684.21 €/ año.

*Ecuación 35: Coste Seguridad Social*

$$\begin{aligned} \text{Coste Seguridad Social} &= (\text{Sueldo bruto} \cdot (\% \cdot 100)) \\ \text{Coste Seguridad Social} \\ &= (17511.96 \cdot 0.2360) + (17511.96 \cdot 0.0070) + (17511.96 \cdot 0.0020) \\ &+ (17511.96 \cdot 0.055) \rightarrow \text{Coste Seguridad Social} = 5253.59 \frac{\text{€}}{\text{año}} \end{aligned}$$

Con este valor se calcula el coste por trabajador, que será:

*Ecuación 36: Coste del trabajador*

$$\text{Coste del trabajador} = \text{Sueldo bruto} + \text{Coste Seguridad Social} + \text{Pagas extras}$$

$$\text{Coste del trabajador} = 17511.96 + 5253.59 + 2918.66 = 25684.21 \frac{\text{€}}{\text{año}}$$

A continuación, en la siguiente tabla, **Tabla 53**, se especifica el coste de cada gasto y el total de trabajar con 2 técnicos de laboratorio en la planta.

Concepto	Coste 8h (€/ año)
Salario base	17511.96
Contingencias comunes	4132.8
Capacitación y formación profesional	122.58
Pagas extras	2918.66
Fondo de Garantía Social	35.02
Tipo general de desempleo	963.16
Total empleado	25684.21
<b>Total planta</b>	<b>51368.42</b>

*Tabla 53: Coste total personal*

Serán necesarios 51368.42 € anuales para la contratación de 2 técnicos de laboratorio que mantengan la plata de extracción de sustancias húmicas.

Realmente, para los 4 meses de trabajo serán necesarios 17122.8 €, para ambos empleados en 4 meses, siendo el salario por mes para cada técnico de 2140.35 €/ mes.

### 6.2.1.2. Coste de amortización

El coste de amortización consiste en dividir los gastos de inversión entre el volumen de producto que puedo generar al año, en este caso cuanto extracto tendré en 4 meses y así

comprobar si el plan establecido de gastos es rentable. Se calcula mediante la siguiente ecuación:

*Ecuación 37: Amortización a 4 meses*

$$A = \frac{GI}{M}$$

Donde:

- A: Gastos de amortización (€/ kg)
- GI: Gastos de inversión (€/ año)
- M: Masa de residuo tratado (kg/ año)

Como no se conoce el volumen de residuo empleado el resto del año en la empresa, se calcula la amortización a 4 meses, que serán los que trabaja la empresa con el residuo de alperujo y para los cuales se tiene datos, siendo:

$$A_{4\text{meses}} = \frac{GI_{4\text{meses}}}{V_{4\text{meses}}} \rightarrow A_{4\text{meses}} = \frac{103.61 \cdot 4}{30000 \text{ kg}} = 0.014 \frac{\text{€}}{\text{kg}}$$

Siendo el coste en 4 meses de la amortización 420 €, ya que al día se emplean 375 kg de residuo de alperujo y se trabaja un total de 80 días en 4 meses.

### 6.2.1.3. Costes de mantenimiento

En estos costes se debe tener en cuenta los gastos de manteniendo de maquinaria como los gastos del cuidado de equipos e infraestructuras de la planta. Por lo que se tiene en cuenta los costes generados por el coste de la reparación/remplazo de la maquinaria, la prevención de fallas, inspecciones regulares, instalaciones donde se realiza el tratamiento, etc.

El mantenimiento de una planta engloba el mantenimiento preventivo, para asegurarse de que toda la maquinaria funciona correctamente, se realiza antes de una avería; el mantenimiento correctivo, es el que se realiza cuando la maquinaria ya se ha averiado y necesita una reparación; y el mantenimiento predictivo, consiste en la observación del proyecto para determinar cuándo es posible que se produzca una avería. En una planta para la extracción de sustancias húmicas se considera que el mantenimiento puede representar entre el 10 % y el 30 % de los gastos de amortización, por lo que se considera un promedio del 20 % de los gastos de amortización, quedando los gastos fijos de la siguiente manera:

Concepto	Gasto (€/ mes)
Personal	4280.7
Amortización	105
Mantenimiento	21
<b>Total costes fijos</b>	<b>4406.7</b>

*Tabla 54: Costes fijos al mes*

Por lo que los costes fijos en los 4 meses de trabajo con el residuo del alperujo serán de:

Concepto	Gasto (€/ 4 meses)
Personal	17122.8
Amortización	420
Mantenimiento	84
<b>Total costes fijos</b>	<b>17626.8</b>

Tabla 55: Costes fijos en 4 meses

## 6.2.2. Costes variables

Los costes variables son aquellos que varían en proporción directa con el nivel de fabricación de la planta, es decir, a medida que la masa de residuo de alperujo varíe los costes variables se ven afectados.

### 6.2.2.1. Costes energéticos

A mayor actividad en la planta mayor consumo energético, y por lo tanto mayor gasto en energía. Por lo que se deben de tener en cuenta las distintas maquinarias y sus respectivos gastos energéticos que componen la planta.

Para obtener el coste estimado se debe tener en cuenta las horas de trabajo, los días que la fábrica se encuentra activa, la cantidad de residuo tratado, el volumen de sustancias húmicas extraídas, el coste energético de la maquinaria empleada y el coste de la potencia energética.

En la planta donde se tratan las sustancias húmicas las maquinarias que consumen energía son los dos reactores y las dos bombas, tanto la de trasvase como la neumática. Sus consumos energéticos se muestran anteriormente, pero se resumen en la siguiente tabla:

Maquinaria	Consumo energético (kW)	Unidades
Bomba trasvase	1.83	1
Reactor	5.5	2
Bomba neumática	3.3	1
<b>Potencia total consumida</b>	<b>10.63</b>	<b>16.13 kW</b>

Tabla 56: Coste energético

Para estimar correctamente el cálculo del coste de la potencia se debe consultar el precio medio de la electricidad en España, el precio de luz en enero de 2023 ha sido de 0.335 €/kW·h, por lo que se considera este valor para realizar los cálculos.

Además, también se debe tener en cuenta las horas en funcionamiento de cada equipo, ya que un reactor siempre estará activo las 24 horas del día, mientras otro tan solo 16 horas diarias, la bomba de trasvase trabajará media hora diaria, pues tan solo se emplea al inicio de la jornada de trabajo, y la bomba neumática trabajará un total de 12 horas, pues cada 2 horas se detiene para el cambio de filtro. El gasto energético total de la planta se calcula mediante la siguiente ecuación:

$$E = \frac{C_w \cdot W \cdot d \cdot t}{V}$$

Donde:

- E: Gasto energético (€/ kg)
- $C_w$ : Coste potencia (€/ kW·h)
- W: Potencia consumida total por la planta (kW)
- d: Días activos al año (días/ año)
- t: Tiempo diario de funcionamiento (h/ día)
- M: Masa tratada en 4 meses (kg/ mes)

$$E = \frac{0.335 \frac{\text{€} \cdot \text{kW}}{\text{h}} \cdot 80 \frac{\text{días}}{\text{año}} \cdot (5.5 \text{ kW} \cdot (24 + 16) \frac{\text{horas}}{\text{día}} + 1.83 \text{ kW} \cdot 0.5 \frac{\text{horas}}{\text{día}} + 3.3 \text{ kW} \cdot 12 \frac{\text{horas}}{\text{día}})}{7500}$$

→  $E = 0.93 \frac{\text{€}}{\text{kg}}$  de alperujo

El coste al mes para tener una producción de 600 L al día de extracto es de 0.93 € el kg de alperujo tratado, por lo que en los 4 meses de trabajo el coste será de 64800 € en 4 meses de trabajo de la planta.

#### 6.2.2.2. Coste del agua

El precio del agua medio en España es de 1.91 €/ m<sup>3</sup>, este precio varía dependiendo de la comunidad autónoma, siendo en la Comunidad Valenciana de 1.31 €/ m<sup>3</sup>. Con este valor y conociendo la cantidad de agua que se utiliza al día se calcula el coste de la empresa en el suministro de agua en los 4 meses de trabajo con el residuo del alperujo.

Al día para realizar la digestión del proceso en uno de los reactores se emplean 1500 L, como es cada 24 horas este proceso, tal volumen de agua solo será empleado en uno de los reactores, por lo que en los 80 días de trabajo serán necesarios 120000 L de agua. Por lo tanto:

*Ecuación 38: Coste agua*

$$\text{Coste agua} = 1.31 \frac{\text{€}}{\text{m}^3} \cdot \frac{1 \text{ m}^3}{1000 \text{ L}} \cdot 120000 \text{ L} = 157.2 \text{ €}$$

Por lo que en 4 meses de trabajo el coste del agua ascenderá a 157.2 €.

#### 6.2.2.3. Material empleado

Para poder realizar la extracción de sustancias húmicas del alperujo se necesita subir el pH del residuo hasta un pH 13, para ello se emplea el hidróxido de potasio (KOH), por lo que se debe de calcular el gasto en este reactivo en los 4 meses de trabajo. El KOH se emplea cuando se carga el reactor, este solo se carga una vez al día, con una cantidad de 9.9 kg al día. El precio

por un bote de 1 kg de este reactivo del proveedor PanReac AppliChem es de 96.90 €, siendo más económico si se pide una caja de 6 unidades, es decir, 6 kg por 82.37 € la botella. Por lo que el precio por el uso de hidróxido en 4 meses es de:

*Ecuación 39: Coste KOH en 4 meses*

$$\text{Cantidad por día} = 9.9 \frac{\text{kg}}{\text{día}}$$

$$\text{Cantidad en 4 meses} = 9.9 \frac{\text{kg}}{\text{día}} \cdot 80 \text{ días} = 792 \frac{\text{kg}}{4 \text{ meses}}$$

$$\text{Precio por unidad} = 82.37 \frac{\text{€}}{\text{kg}}$$

$$\text{Precio total en 4 meses} = \frac{82.37\text{€}}{\text{kg}} \cdot 792 \frac{\text{kg}}{4 \text{ meses}} = 65237 \frac{\text{€}}{4 \text{ meses}}$$

Por lo que se deben pedir 65237 botellas de este reactivo en 4 meses, siendo el precio en este periodo de 65237 €.

Por lo que se concluye que los costes variables totales son de:

Concepto	Precio (€/ mes)
Coste energético	16200
Coste del agua	39.3
Reactivo KOH	16309.25
<b>Total costes variables</b>	<b>32548.55</b>

*Tabla 57: Costes variables al mes*

Concepto	Precio (€/ 4 mes)
Coste energético	64800
Coste del agua	157.2
Reactivo KOH	65237
<b>Total costes variables</b>	<b>130194.2</b>

*Tabla 58: Costes variables en 4 meses*

Este coste variable no corresponde realmente con el que se tendría en la planta, ya que son aproximaciones en las que no se ha tenido en cuenta el gasto de la iluminación de la planta y otros posibles gastos asociados a la producción o con los empleados.

### 6.2.3. Costes totales

El coste total de la planta es el último paso, pues consiste en la suma de los costes fijos y variables anteriormente calculados y explicados.

*Ecuación 40: Costes totales explotación*

$$\text{Costes totales explotación} = \text{Costes fijos} + \text{Costes variables}$$

$$\text{Costes totales explotación} = 17626.8 + 130194.2 = 147821 \text{ €}$$

Serán necesarios 147663.8 € en 4 meses para llevar a cabo la operación de la extracción de sustancias húmicas a partir de residuos de alperujo de una almazara.

### 6.3. Beneficios

El precio de venta del bioestimulante en el que se han basado los cálculos de **Escalado industrial** es de 43.95 € la garrafa de 20 L, por lo que el litro sale a 2.20 €/L. Conociendo esta información se debe calcular el coste que tiene para la planta la extracción de cada litro de extracto.

Para ello se conoce el coste total de producción y también se sabe el volumen que se extrae en 4 meses de trabajo. El coste total es de 147821 € (**Ecuación 40**) y la producción en 80 días de trabajo es de 48000 L. Por lo que la extracción del litro es a 3.08 €/L.

*Ecuación 41: Coste producción*

$$\text{Coste producción} = \frac{147821\text{€}}{48000\text{L}} = 3.08 \frac{\text{€}}{\text{L}}$$

Equiparando este valor con el comercial se puede ver como la extracción en la planta por litro tiene un precio más elevado, ya que en una garrafa de 20 L será necesario invertir 61.6 € para su extracción; y estimando que el precio de venta sea este la comercialización del extracto no saldrá beneficiosa. Pues el comercial tiene un total de 1000 usos debido a que su dilución es 20 mL en 1 L de agua, y las garrafas son de 20 L; mientras que una garrafa de 20 L donde las diluciones deben ser 270 mL en 1L de agua su vida es de 74 usos, por lo que se debe comercializar a un precio menor ya que ofrece menor uso. Concluyendo que la comercialización de este producto no proporcionará beneficios.

El flujo de caja que se genera con este producto es de:

*Ecuación 42: Flujo de caja*

$$\text{Flujo de caja} = \text{Beneficios} - \text{Costes totales explotación}$$

$$\text{Flujo de caja} = (3.08 \cdot 48000) - 147821 = 19 \frac{\text{€}}{4 \text{ meses}}$$

Se han calculado los beneficios suponiendo que se venden los litros de extracción al mismo precio que el coste de su producción; ya que ya se ha visto que un precio mayor no sería viable por competencia con el mercado. Para comprobar estos hechos se calcula el VAN y el TIR.

#### 6.3.1. VAN

El VAN es el valor actual neto, se trata de un índice de inversión con el que conocer cuánto se va a ganar o perder con la inversión, para saber si resulta rentable llevarla a cabo. Se define con la siguiente ecuación:

$$VAN = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1+k)^t}$$

Donde:

- $D_0$ : Desembolso inicial (Coste total explotación)
- $F$ : Flujo de caja
- $t$  y  $n$ : Valor de períodos, cada uno de los años
- $k$ : Tipo de interés exigido en la inversión; el valor óptimo es entre el 5 % y el 100 %, por lo que se calcula con el caso más desfavorable, 5 %.

Si este valor de VAN sale:

- $VAN > 0$ : Se generan beneficios
- $VAN = 0$ : La inversión no genera ni pérdidas ni beneficios
- $VAN < 0$ : Se pierde dinero

El VAN de esta inversión queda:

$$VAN = -147821 + \frac{19}{(1+0.05)^1} + \frac{19}{(1+0.05)^2} + \frac{19}{(1+0.05)^3} + \dots + \frac{19}{(1+0.05)^{10}}$$

$$VAN = -147674 \text{ €}$$

Es decir, una inversión negativa, por lo que se perdería dinero en este proyecto. Para conocer con que valor de flujo de caja este proyecto sería rentable se emplea la herramienta Solver del programa Excel, para estimar un valor de VAN positivo y que se calcule el flujo de caja óptimo y el precio de venta del litro de extracción; por lo que en este cálculo el valor desconocido será el flujo de caja.

$$1564613.48 = -147821 + \frac{F}{(1+0.05)^1} + \frac{F}{(1+0.05)^2} + \frac{F}{(1+0.05)^3} + \dots + \frac{F}{(1+0.05)^{10}}$$

$$F = 92179 \frac{\text{€}}{4 \text{ meses}}$$

Por lo que si se vende el litro de extracto a 5 €/L se obtiene beneficios en la planta industrial; estos beneficios serán del 38.4 %, siendo rentable la comercialización de este fertilizante a partir de residuo de alperujo.

### 6.3.2. TIR

El TIR es la Tasa Interna de Retorno, este índice indica la rentabilidad de la inversión, es decir, el porcentaje de beneficio o pérdida que tendrá una inversión. Para considerar que la

inversión es rentable este tiene que estar entre el 5 % y el 100 %. Una cantidad menor al 5 %, tendrá un margen de riesgo frente a beneficios demasiado bajo y, por otro lado, valores cercanos al 100 % parecen bastante irreales puesto que otorgan un beneficio estratosférico y una fracción muy pequeña de los negocios llegan a este porcentaje. La fórmula del *TIR* genera un *VAN* igual a 0. Por lo que la ecuación queda:

*Ecuación 45: Cálculo TIR*

$$0 = -D_0 + \sum_{t=1}^n \frac{F}{(1 + TIR)^t}$$

Donde:

- $D_0$ : Desembolso inicial
- $F$ : Flujo de caja
- $t$  y  $n$ : Valor de períodos, cada uno de los años
- $TIR$ : Tasa Interna de Retorno

Si este índice sale:

- $TIR > k$ : La tasa de rendimiento que se obtiene es superior a la tasa mínima de rentabilidad exigida a la inversión
- $TIR = k$ : Sucede algo similar a cuando el *VAN* es 0
- $TIR < k$ : No se alcanza la rentabilidad, el proyecto no debe llevarse a cabo

El *TIR* se va a calcular con el flujo de caja rentable, *Ecuación 44*.

$$0 = -147821 + \frac{92179}{(1 + TIR)^1} + \frac{92179}{(1 + TIR)^2} + \frac{92179}{(1 + TIR)^3} + \dots + \frac{92179}{(1 + TIR)^{10}}$$

$$TIR = 61.8 \%$$

Al ser un valor mayor que el 5 % se considera un proyecto rentable, en el que se obtendrían beneficios.

## 7. Conclusiones

Una vez obtenidos y estudiados los resultados experimentales, diseñado el escalado industrial basándose en el procedimiento seguido en el laboratorio y realizado un análisis aproximativo de los costes de llevar a cabo el proyecto, se concluye que:

- La caracterización de los residuos de alperujo indica una alta presencia de humedad, en torno al 60 % y un elevado contenido en carbono cercano a 60.77 %.
- El pH óptimo para la obtención de sustancias húmicas es el pH 13, pues se ha comprobado que, a pH menores, pH 9 y 11, la materia orgánica que se extrae no tiene las características de las sustancias húmicas.
- Todos los extractos han demostrado tener una cierta capacidad de complejación de hierro en disolución, obteniendo mejores resultados los extractos realizados a pH 13.
- La utilización de las sustancias húmicas extraídas como bioestimulante para semillas de tomate ha dado resultados apreciable, pero sin grandes diferencias. Se aprecia una mejora en presencia de los extractos a pH 13 que no alcanza la mejora obtenida por un fertilizante comercial.
- El volumen para tratar por día de extractos de sustancias húmicas es de 600 litros en un día, para alcanzar el volumen de 48000 litros extraídos en 4 meses de trabajo, y así poder tratar 30000 kg de residuo de las almazaras.
- Gracias al estudio de costes se puede indicar que el proceso tal y como se ha calculado no es competitivo frente a productos comerciales. Trabajar a mayor escala y afinar más en los costes de reactivos y equipos podría acercar nuestros costes a los costes de mercado.

## Bibliografía

- [1] National Geographic. (10 de abril de 2023). *¿Qué es el calentamiento global?* Obtenido de <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/que-es-el-calentamiento-global>
- [2] Ghussain, L. A. (5 de octubre de 2018). Global Warming: Review on Driving Forces and Mitigation. En A. I. (AIChE), *Environmental Progress & Sustainable Energy (Vol.38, No.1)* (págs. 13-21). Jordania: Wiley online Library.
- [3] Iberdrola. (2023). *Sostenibilidad- Huella de Carbono*. Obtenido de ¿Qué es la huella de carbono y por qué es vital reducirla para frenar el cambio climático?: <https://www.iberdrola.com/sostenibilidad/huella-de-carbono>
- [4] Secretaría de estado de Medio Ambiente. (marzo de 2023). *Inventario Nacional de Emisiones a la Atmósfera*. Obtenido de Emisiones de Gases de Efecto Invernadero- Informe resumen(1990-2021): [https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/resumen\\_inventario\\_gei\\_ed\\_2023\\_tcm30-560383.pdf](https://www.miteco.gob.es/es/calidad-y-evaluacion-ambiental/temas/sistema-espanol-de-inventario-sei-/resumen_inventario_gei_ed_2023_tcm30-560383.pdf)
- [5] Ellen Macarthur. (14 de abril de 2023). *¿Qué es la economía lineal?* Obtenido de <https://ellenmacarthurfoundation.org/es/que-es-la-economia-lineal>
- [6] Nunez, C. (1 de junio de 2023). *Medio Ambiente*. Obtenido de Explicación de qué son los combustibles fósiles: <https://www.nationalgeographic.es/medio-ambiente/explicacion-que-son-combustibles-fosiles>
- [7] Cerdá, E., & Khalilova, A. (2016). *Economía circular, estrategia y competitividad empresarial*. Obtenido de Economía circular: <https://www.mincotur.gob.es/Publicaciones/Publicacionesperiodicas/EconomiaIndustrial/RevistaEconomiaIndustrial/401/CERD%C3%81%20y%20KHALILOVA.pdf>
- [8] Repsol. (22 de junio de 2023). *Economía circular*. Obtenido de ¿Qué es la economía circular?: <https://www.repsol.com/es/sostenibilidad/economia-circular/index.cshtml>
- [9] Alberto. (25 de junio de 2020). *Reciclamás*. Obtenido de Descubre las 7rs de la economía circular: <https://reciclamas.eu/blog/descubre-las-7rs-de-la-economia-circular/>
- [10] Santander. (15 de septiembre de 2021). *Economía lineal y circular*. Obtenido de ¿Qué son y en qué se diferencian?: <https://www.santander.com/es/stories/economia-lineal-y-circular-a-que-se-refieren-cada-uno-de-estos-terminos-y-cuales-son-sus-diferencias>

- [11] Savci, S. (5 de enero de 2012). Investigation of Effect of Chemical Fertilizers on Environment. *SciVerse ScienceDirect*, 287-292.
- [12] Pahalvi, H., Rafiya, L., Rashid, S., Nisar, B., & Kamili, A. (2021). Chemical Fertilizers and Their Impact on Soil Health. En G. Dar, R. Bhat, M. Mehmood, & K. Hakeem, *Microbiota and Fertilizers, Vol2* (págs. 1-20). Springer.
- [13] AEFA. (s.f.). *Fertilizante nitrogenado*. Obtenido de <https://aeфа-agronutrientes.org/fertilizante-nitrogenado>
- [14] INTAGRI. (Septiembre de 2018). *Nutrición Vegetal*. Obtenido de Guía de Fertilizantes Fosfóricos para Cultivos: [https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/guia-de-fertilizantes-fosforicos-para-cultivos#:~:text=El%20f%C3%B3sforo%20y%20su%20importancia%20vegetal&text=La%20adecuada%20nutrici%C3%B3n%20con%20P,con%20P%20\(Ver%20m%C3%A1s\)](https://www.intagri.com/articulos/nutricion-vegetal/guia-de-fertilizantes-fosforicos-para-cultivos#:~:text=El%20f%C3%B3sforo%20y%20su%20importancia%20vegetal&text=La%20adecuada%20nutrici%C3%B3n%20con%20P,con%20P%20(Ver%20m%C3%A1s)).
- [15] Ecodes. (9 de enero de 2008). *Archivo ecodes- Actualidad Sostenible*. Obtenido de La agricultura industrial contribuye al calentamiento global: <https://archivo.ecodes.org/web/noticias/la-agricultura-industrial-contribuye-al-calentamiento-global>
- [16] López Millán, A. (febrero de 2000). *Digital.CSIC*. Obtenido de Adquisición y transporte de hierro en plantas: <http://hdl.handle.net/10261/9600>
- [17] Kobayashi, T., Nozoye, T., & Nishizawa, N. (2018). Iron transport and its regulation in plants. *Elsevier- Free Radical Biology and Medicine*, 11-20.
- [18] Seipasa. (18 de febrero de 2021). *El hierro en las plantas: por qué es importante ponerlo a disposición para corregir la clorosis férrica*. Obtenido de <https://www.seipasa.com/es/blog/hierro-en-las-plantas-y-correccion-de-la-clorosis-ferrica/>
- [19] Inti Fertilizantes. (23 de agosto de 2021). *¿Cuáles son los beneficios de un suelo nutrido y fértil?* Obtenido de <https://www.facebook.com/IntiFertilizantes/photos/a.125339408016862/941305939753534/?type=3>
- [20] Fernanades, A. Z. (8 de mayo de 2019). *Diferenciador*. Obtenido de Monocotiledóneas y dicotiledóneas: <https://www.diferenciador.com/monocotiledoneas-y-dicotiledoneas/#:~:text=Las%20monocotiled%C3%B3neas%20son%20las%20plantas,semilla%2C%20es%20una%20hoja%20embrionaria>

- [21] Barra Zúñiga, R. (2018). *Proyecto de Investigación*. Obtenido de Efecto de vivianita versus quelato de hierro EDDHA, sobre la disponibilidad de hierro activo en suelos calcáreos, para disminuir el problema de clorosis férrica: [http://opac.pucv.cl/pucv\\_txt/txt-8500/UCC8521\\_01.pdf](http://opac.pucv.cl/pucv_txt/txt-8500/UCC8521_01.pdf)
- [22] Silos del Cinca. (1 de julio de 2020). *Soluciones agrícolas*. Obtenido de ¿Por qué aplicamos quelato de hierro a los cultivos?: <https://www.silosdelcinca.com/sin-categoria/aplicamos-quelato-hierro-los-cultivos/#:~:text=El%20quelato%20de%20hierro%20es,arb%C3%B3reos%20y%20de%20plantas%20ornamentales.>
- [23] Agropinos. (17 de agosto de 2022). *Beneficios de los fertilizantes orgánicos en sus cultivos*. Obtenido de <https://www.agropinos.com/blog/las-ventajas-de-los-fertilizantes-organicos>
- [24] AEFA. (s.f.). *Fertilizantes orgánicos, órgano- minerales y enmiendas orgánicas*. Obtenido de <https://aeфа-agronutrientes.org/fertilizantes-organicos-organo-minerales-y-enmiendas-organicas>
- [25] AEFA. (s.f.). *Humus*. Obtenido de <https://aeфа-agronutrientes.org/glosario-de-terminos-utiles-en-agronutricion/humus>
- [26] Plantae. (15 de octubre de 2022). *¿Qué es el purín?* Obtenido de <https://plantae.garden/purin-estiercol-fertilizantes/>
- [27] Triana, E. Y. (2019). *Escuela de Ciencias Agrícolas Pecuarias y del Medio Ambiente*. Obtenido de Evaluación de dos tipos de fertilizantes orgánicos comparados con fertilización convencional, en el cultivo de arroz: <https://repository.unad.edu.co/bitstream/handle/10596/28026/eyperetz.pdf?sequence=3&isAllowed=y>
- [28] PyMerural. (2011). *Producción orgánica de hortalizas de clima templado*. Obtenido de Abonos orgánicos: <http://bvirtual.infoagro.hn/xmlui/bitstream/handle/123456789/106/Manual%20de%20elaboracion%20de%20abono%20organico.pdf?sequence=1>
- [29] Albert, M. O. (s.f.). Efectos fisiológicos de las sustancias húmicas sobre los mecanismos de toma de hierro en plántulas de tomate. *Universidad de Alicante*, 38-49.
- [30] Negueroles, P. G. (2021). Empleo de sustancias tipo húmicas obtenidas a partir de diferentes residuos orgánicos en la eliminación de contaminantes emergentes. *Universidad Politécnica de Valencia- Departamento de Ingeniería Textil y Papelera*, 21-26.

- [31] Muñóz, G. T. (2007). Extracción de materia orgánica soluble de un compost de orujo de oliva de dos fases. *Facultad de Química- Universidad de Murcia*, 2-28.
- [32] Zanin, L., Tomasi, N., Cesco, S., Varanini, Z., & Pinton, R. (2019). Humic substances contribute to plant iron nutrition acting as chelators and biostimulants. *Frontier in Plant Science*, 1-10.
- [33] Cruz, J., Canet, R., Pomares, F., & Albiach, R. (s.f.). Extractos hidrosolubles y húmicos obtenidos de un compost y de un vermicompost derivados de la mezcla de alperujos con otros residuos agrícolas. En J. Cruz, R. Canet, F. Pomares, & R. Albiach, *Suelos y fertilizantes. cap5* (págs. 1095-1108). Valencia: IVIA.
- [34] Cincolivas Blog. (10 de mayo de 2018). *El alpechín, el orujo y el alperujo*. Obtenido de <https://www.cincolivas.com/blog/el-alpechin-el-orujo-y-el-alperujo/>
- [35] Fundación, A. (28 de diciembre de 2021). *Agua destilada: definición y propiedades*. Obtenido de <https://www.fundacionaquae.org/wiki/que-es-agua-destilada/>
- [36] Akralab. (2021). *Catálogo 2021- Equipos de laboratorio*. Obtenido de <https://www.akralab.es/wp-content/uploads/2021/10/catalogo-general-akralab-2020.pdf>
- [37] FLMedical. (1 de febrero de 2023). *Petri dishes*. Obtenido de Microbiology products: <https://www.flmedical.com/plastic-laboratory-products/petri-dishes/>
- [38] Agroambiental, L. (14 de marzo de 2023). *phmetro*. Obtenido de <https://www.aragon.es/-/laboratorio-agroambiental-equipos-antiguos-phmetro>
- [39] Scientific, F. (2023). *Fisher Scientific Inc.* Obtenido de <https://www.fishersci.es/shop/products/welch-standard-duty-wob-l-piston-vacuum-pump-model-2546-2/p-4903065>
- [40] Shimadzu. (29 de noviembre de 2022). *Shimadzu, instrumentos analíticos y de medida*. Obtenido de <https://www.shimadzu.com/an/products/total-organic-carbon-analysis/toc-analysis-system/ssm-5000a/index.html>
- [41] Panalytical, M. (2023). *Dispersión de luz dinámica (DLS)*. Obtenido de Dispersión de luz dinámica (DLS): <https://www.malvernpanalytical.com/es/products/technology/light-scattering/dynamic-light-scattering>
- [42] Analítica, A. (2022). *¿Para que sirve un Espectro- fluorómetro?* Obtenido de ¿Para que sirve un Espectro- fluorómetro?: <https://www.agsanalitica.com/que-es-la-fluorescencia#:~:text=%C2%BFQu%C3%A9%20es%20y%20para%20qu%C3%A9,o%20fluor%C3%ADmetro%2C%20mide%20la%20fluorescencia.>

- [43]x-rite. (03 de marzo de 2022). *¿Qué mide un espectrofotómetro?* Obtenido de ¿Qué mide un espectrofotómetro?: <https://www.xrite.com/es/blog/what-does-a-spectrophotometer-measure#:~:text=Un%20espectrofot%C3%B3metro%20mide%20la%20luz,diferentes%20porciones%20del%20espectro%20visible.>
- [44]Avantar. (s.f.). *VWR® Hitachi UH5300, UV/Visible spectrophotometer*. Obtenido de: VWR® Hitachi UH5300, UV/Visible spectrophotometer: <https://es.vwr.com/store/product/11281585/uv-visible-spectrophotometer-uh5300>
- [45]Hanna Instruments. (s.f.). *¿Qué es la demanda química de oxígeno?* Obtenido de <https://www.hannacolombia.com/blog/post/587/que-es-la-demanda-quimica-oxigeno>
- [46]Universidad de Alicante. (2022). *Servicios Técnicos de Investigación*. Obtenido de <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-analisis-termico/calorimetria-diferencial-de-barrido.html>
- [47]Universidad de Alicante. (2022). *Servicios Técnicos de Investigación*. Obtenido de Análisis elemental: <https://ssti.ua.es/es/instrumentacion-cientifica/unidad-de-rayos-x/analisis-elemental.html>
- [48]Khan Academy. (s.f.). *El pH, pOH y la escala de pH*. Obtenido de <https://es.khanacademy.org/science/ap-chemistry/acids-and-bases-ap/acids-bases-and-ph-ap/a/ph-poh-and-the-ph-scale>
- [49]Klucakova, M. (2018). Size and charge evaluation of standard humic and fulvic acids as crucial factors to determinate their environmental behaviour and impact. *Frontiers in Chemistry*, 235.
- [50]Clarizia, L. R. (2017). Homogenous photo-Fenton processes at near neutral pH: A review. *Applied Catalysis B: Environmental*, 358-371.
- [51]Sciscenko, I. A. (2022). Emerging applications of EEM-PARAFAC for water treatment: a concise review, vol.10. *Chemical Engineering Journal Advances*.
- [52]Cultivers. (s.f.). *Amazon*. Obtenido de Abono de ácidos húmicos y fúlvicos: <https://www.amazon.es/ecoforce-Force-HUMIC-h%C3%B3micos-f%C3%BAlvicos-leonardita/dp/B07CB4R6L1?th=1>