

Angélica García Quintero^{1,2}, Enrique Combatt³, Manuel Palencia^{2*}

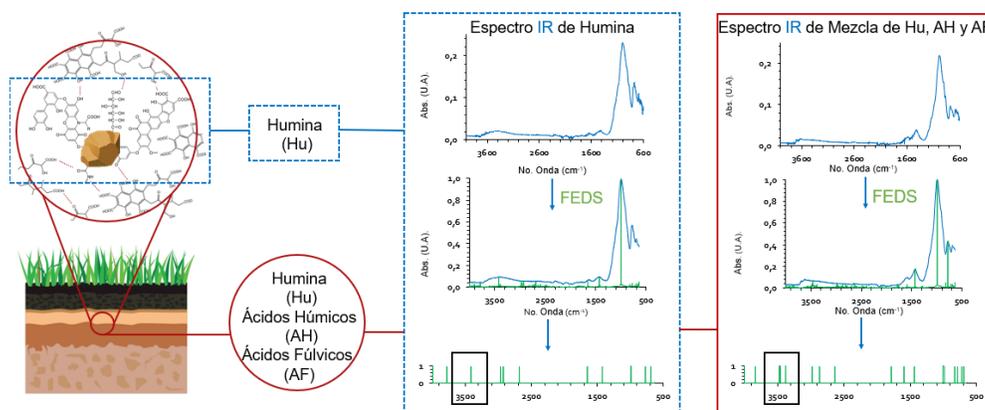
¹ Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

³ Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería – Colombia

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Graphical abstract



Estudio estructural de la humina y sus interacciones con ácidos húmicos mediante espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier

Resumen

La materia orgánica es un componente primordial en el suelo, debido a que se encuentra asociada a la regulación de las condiciones y propiedades del sistema natural, por lo que es considerada un indicativo de la calidad en los suelos. A su vez, se encuentra constituida por diversas sustancias, entre las que destaca la materia orgánica humificada (MOH), un polieléctrolito compuesto por ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y humina (Hu), esta última fracción ha sido poco estudiada, a causa de su limitada solubilidad. No obstante, es de interés conocer sus características, puesto que en ella ocurre una interacción íntima entre las sustancias orgánicas e inorgánicas del suelo. En esta investigación fue desarrollado un análisis estructural de la Hu de tres suelos colombianos, empleando espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Para ello, se efectuó el pretratamiento de las muestras de suelo, su caracterización fisicoquímica, la extracción de la materia soluble, los AF, los

Palabras claves

Humina
Ácidos húmicos
Ácidos Fúlvicos
Enlace de Hidrógeno
Espectroscopia de Infrarrojo

AH y el complejo Hu-arcilla. Posteriormente, cada una de estas fracciones fue analizada mediante ATR y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), reflejando una similitud en estructura y composición entre la Hu y los AH. Con relación a las interacciones intermoleculares presentes entre la Hu y moléculas orgánicas, estas fueron estudiadas mediante ATR y espectroscopia derivativa realzada funcionalmente (FEDS), evidenciando un desplazamiento en la banda de vibración del hidroxilo a menor número de onda, lo que sugiere la presencia de enlaces de hidrógeno en la formación de agregados supramoleculares.

Structural study of humin and its interaction with humic acids by Fourier-transform mid-infrared spectroscopy

Abstract

Organic matter is a fundamental component in the soil, because it is associated with the regulation of the conditions and properties of this natural system, that is why it is considered an indicator of soil quality. At the same time, it is constituted by several substances, among which the humified organic matter (MOH) stands out, a polyelectrolyte composed of humic acids (AH), fulvic acids (AF) and humin (Hu), this last fraction has been sparsely studied, cause of its limited solubility. However, it is interest to know their characteristics, since in it an intimate interaction takes place between the organic and inorganic substances of the soil. In this research, a structural analysis of the humin of three Colombian soils was developed, using infrared spectroscopy with Fourier transform (FTIR) in the attenuated total reflectance technique (ATR). For this, the pre-treatment of the soil samples, their physico-chemical characterization, the extraction of the soluble matter, the AF, the AH and the Hu-clay complex were carried out. Subsequently, each of these fractions was analyzed by ATR and the Pearson correlation coefficient (R^2), reflecting a similarity in structure and composition between the Hu and the AH. Regarding the intermolecular interactions between humin and organic molecules, these were studied by ATR and functionally-enhanced derivative spectroscopy (FEDS), evidencing a displacement in the hydroxyl vibration band at a lower wave number, which suggests the presence of hydrogen bonds in the formation of supramolecular aggregates.

Keywords

Humin
Fulvic acid
Humin acid
Hydrogen band
Infrared spectroscopy

Received: 08-03-2018

Accepted: 02-04-2018

Publishing date: 15 - Mayo - 2018

Revision Code: 20180908-EMCC [Pag. 28 - 39]

Corresponding author:

manuel.palencia@correounivalle.edu.co



Estudio estructural de la humina y sus interacciones con ácidos húmicos mediante espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier

Angélica García Quintero^{1,2}, Enrique Combatt³, Manuel Palencia^{2*}

¹ Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

³ Departamento de Ingeniería Agronómica y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería – Colombia

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Resumen

La materia orgánica es un componente primordial en el suelo, debido a que se encuentra asociada a la regulación de las condiciones y propiedades del sistema natural, por lo que es considerada un indicativo de la calidad en los suelos. A su vez, se encuentra constituida por diversas sustancias, entre las que destaca la materia orgánica humificada (MOH), un polieléctrolito compuesto por ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y humina (Hu), esta última fracción ha sido poco estudiada, a causa de su limitada solubilidad. No obstante, es de interés conocer sus características, puesto que en ella ocurre una interacción íntima entre las sustancias orgánicas e inorgánicas del suelo. En esta investigación fue desarrollado un análisis estructural de la Hu de tres suelos colombianos, empleando espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR) en la técnica de reflectancia total atenuada (ATR). Para ello, se efectuó el pretratamiento de las muestras de suelo, su caracterización fisicoquímica, la extracción de la materia soluble, los AF, los AH y el complejo Hu-arcilla. Posteriormente, cada una de estas fracciones fue analizada mediante ATR y el coeficiente de correlación de Pearson (R^2), reflejando una similitud en estructura y composición entre la Hu y los AH. Con relación a las interacciones intermoleculares presentes entre la Hu y moléculas orgánicas, estas fueron estudiadas mediante ATR y espectroscopia derivativa realizada funcionalmente (FEDS), evidenciando un desplazamiento en la banda de vibración del hidroxilo a menor número de onda, lo que sugiere la presencia de enlaces de hidrógeno en la formación de agregados supramoleculares.

Palabras Claves

Humina
Ácidos húmicos
Ácidos fúlvicos
Enlace de hidrógeno
Espectroscopia de infrarrojo

1. Introducción

El suelo es un sistema natural que ocurre en los primeros metros de la superficie terrestre. Se caracteriza por ser dinámico, abierto y complejo. Adicional a ello, mantiene el equilibrio de los ciclos biogeoquímicos mediados por organismos y

gobierna la productividad de las plantas [1]. El suelo se encuentra constituido por tres fases: una líquida, compuesta por agua y las sustancias disueltas en ésta; una gaseosa, de composición similar a la del aire atmosférico; y una fase sólida, integrada por sustancias de naturaleza inorgánica y orgánica, la primera de éstas hace referencia a los minerales del

suelo y la segunda a la materia orgánica del suelo, definida como una mezcla compleja y heterogénea de origen vegetal y microbiano [1-2].

La materia orgánica en el suelo (MO) con frecuencia comprende un volumen entre el 1,0 % y el 6,0 %; en contraste con este aparente mínimo porcentaje, la MO representa una fracción primordial del suelo, debido a que reduce los efectos de compactación, actúa como un amortiguador ante los cambios de pH, ejerce una influencia considerable en la textura del suelo y se encuentra directamente relacionada con la capacidad de intercambio catiónico de los suelos, la que a su vez, se asocia directamente con la fertilidad; por estas razones, el contenido de MO es considerado como uno de los mayores indicadores de calidad en los suelos [1,3,4].

La MO abarca a la materia orgánica viva, no viva y humificada [1]. Esta última, corresponde a una mezcla compleja y heterogénea de sustancias orgánicas, formada mediante la actividad biológica de microorganismos y las transformaciones bioquímicas de residuos orgánicos; las estructuras moleculares presentes en esta sustancia pueden analizarse como constituidas por distintos bloques de formación en orden aleatorio, estas unidades estructurales corresponden a segmentos alifáticos, anillos aromáticos, unidades de carbohidratos, aminoácidos, hidroxiquinonas, grupos funcionales de carácter polar como el hidroxilo y el fenol, grupos funcionales carbonílicos como el ácido carboxílico, el éster y la cetona [5-8]. Algunos de ellos, en especial los que presentan enlaces O-H, contribuyen a la generación de complejos y se relacionan con la capacidad de intercambio catiónico en los suelos. Estas características estructurales y comportamiento químico permiten considerar a la MOH como un polielectrolito orgánico de origen natural [9]. Esta puede ser clasificada empleando un criterio de solubilidad en tres fracciones principales: AF, solubles en cualquier condición de pH; AH, insolubles en condiciones ácidas y Hu, insoluble en todo rango de pH [6,10]. Esta última sustancia ha sido estudiada como un complejo resultante de la interacción íntima entre los AH y las partículas inorgánicas presentes en el suelo [11]. A su vez, la Hu suele constituir alrededor del 20% de la MO, sin embargo, a causa de sus características de solubilidad ha sido analizada en menor medida que las demás sustancias húmicas, debido a que su solubilización

implica un proceso de degradación y fraccionamiento; pese a estas dificultades, el estudio de las características estructurales de la Hu constituye un campo de gran interés, debido a que la conexión entre la parte mineral y los componentes orgánicos del suelo converge en los complejos de Hu y arcilla. Es por ello que, la comprensión de la estructura e interacciones de la Hu provee notable información acerca de las interacciones entre las sustancias orgánicas e inorgánicas en la MOH [1,8,10,12].

Con base en lo expuesto con anterioridad, es de gran interés el desarrollo de un estudio estructural de la Hu y sus interacciones con otros componentes de la MOH, específicamente en función de las proporciones de estas sustancias. Este análisis puede ser desarrollado empleando el complejo resultante de la interacción entre la Hu y la arcilla, de esta manera se evita la degradación química y alteración estructural de la Hu, causada en el proceso convencional de extracción mediante una mezcla fuertemente ácida compuesta por ácido clorhídrico (HCl) y ácido fluorhídrico (HF) [11].

En cuanto a la técnica de análisis, el estudio estructural de la Hu puede ser llevado a cabo mediante la espectroscopia de infrarrojo, método empleado en la identificación y caracterización estructural de sustancias mediante su perfil químico [1,13]. Esta técnica ha sido empleada en la ciencia de suelos para efectuar análisis agrícolas y estructurales, debido a que presenta una considerable sensibilidad hacia las fases orgánicas e inorgánicas del suelo; adicional a esto, la región media del infrarrojo permite observar las bandas asociadas a la vibración fundamental de los enlaces entre los átomos y el cambio en la frecuencia y el ancho de algunas de las bandas de vibración, lo que permite la identificación de los grupos funcionales y el estudio cualitativo de las interacciones intermoleculares en las muestras de suelo mediante una medición directa [1, 14, 15]. Por otra parte, la espectroscopia de infrarrojo en la técnica de reflectancia total atenuada permite el análisis de sustancias de forma no invasiva con una considerable precisión, alta reproducibilidad y ausencia de pretratamientos en la mayoría de los casos, características que hacen de esta, una técnica de interés para efectuar un análisis estructural de las sustancias que componen la MOH [1, 16, 17].

Con base en lo anterior, el propósito de esta investigación consiste en desarrollar un estudio estructural de la Hu y sus interacciones con los AH,

los AF y moléculas de bajo peso molecular con grupos funcionales característicos de la MOH, mediante espectroscopia de infrarrojo medio con transformada de Fourier en la técnica de ATR.

2. Sección experimental

2.1 Reactivos y materiales

Acetato de amonio (Merck, Alemania), fosfato de sodio (Merck, Alemania), carbonato de sodio (Merck, Alemania), formaldehído (Merck, Alemania), ácido sulfúrico (Merck, Alemania), dicromato de potasio (Merck, Alemania), sulfato ferroso de amonio (Aldrich, USA) y ortofenantina (Aldrich, USA), fueron empleadas en el proceso de caracterización fisicoquímica de las muestras de suelos. Agua destilada fue utilizada como disolvente.

Hidróxido de sodio (Aldrich, USA) y ácido clorhídrico (Aldrich, USA), fueron empleados en el proceso de extracción y separación de las sustancias húmicas. Membrana de celulosa de 10 kDa (Millipore, USA) fue utilizada en la purificación de los AF.

Ácido acético (AA, Aldrich, USA), sorbitol (So, Aldrich, USA) y fenol (Ph, Aldrich, USA) fueron empleados en la constitución de las mezclas de Hu con sustancias orgánicas.

2.2 Obtención de la humina

Con el propósito de efectuar un análisis estructural de la Hu y sus interacciones con los demás componentes de la MOH, se emplearon tres suelos con distinta procedencia de los departamentos del Valle del Cauca y Córdoba en Colombia. El origen y designación de cada una de las muestras se presenta a continuación (Tabla 1).

2.3 Pretratamiento y caracterización fisicoquímica

En primera instancia, las muestras de suelo se llevaron a sequedad a temperatura ambiente. A continuación, fueron homogenizadas mediante molienda y tamizadas empleando un tamiz con un tamaño de poro de 2 mm. La caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo fue llevada a cabo en el Laboratorio de Suelos y Aguas de la Universidad de Córdoba en Montería, Colombia.

Tabla 1. Origen y denominación de las muestras de suelos.

Muestra	Origen
Suelo 1 (S ₁)	Suelo rural del Valle del Cauca, Colombia
Suelo 2 (S ₂)	Suelo rural de Córdoba, Colombia Suelo urbano del Valle del Cauca,
Suelo 3 (S ₃)	Colombia

En este se determinó el pH de cada muestra mediante un método potenciométrico, la textura por el método de Boyoucos, la capacidad de intercambio catiónico (CIC) usando el método de acetato de amonio 1,0 N y el contenido de materia orgánica (CMO) mediante oxidación química con el protocolo de Walkley y Black [18]. A continuación, se encuentra descrita cada una de las metodologías empleadas para realizar las determinaciones de las propiedades fisicoquímicas en las muestras de suelo.

2.3.1 Determinación del pH: Para establecer el grado de acidez de los suelos; a 10,0 g de la muestra de suelo le fue adicionado un volumen de agua destilada hasta la formación de la pasta de saturación, aproximadamente en una relación 1:1, masa de suelo: volumen de agua destilada, respectivamente. A continuación, se situó el electrodo de pH en el sistema y se determinó el valor de la lectura [19].

2.3.2 Determinación de la textura: Con el propósito de establecer la textura de los tres suelos empleados en el análisis estructural de la Hu; 60,0 g de la muestra de suelo se depositaron en 400,0 mL de agua destilada, a la cual previamente le fue adicionado 10,0 mL de una solución de dispersante químico (fosfato de sodio y carbonato de sodio). Posteriormente, las muestras fueron sometidas a agitación. A continuación, la suspensión fue dejada en reposo y se realizaron las lecturas mediante el hidrómetro, para luego establecer la textura de la muestra mediante el uso del triángulo textural [20].

2.3.3 Determinación de la CIC: Esta propiedad fue establecida mediante el método del acetato de amonio 1,0 N descrito por el instituto geográfico Agustín Codazzi (IGAC), este consiste en situar una masa de la muestra de suelo en contacto con 10,0 mL de una solución de acetato de amonio (CH₃OONH₄) con concentración 1,0 N, esto con el objetivo de efectuar el proceso de intercambio

catiónico entre las bases y el catión amonio. A continuación, se procedió a filtrar la muestra y cuantificar los cationes de amonio en exceso mediante su titulación con formaldehído (CHOH) [21].

2.3.4 Determinación del contenido de materia orgánica: El CMO fue establecido mediante la oxidación química establecida en el método de Walkley y Black. Este consiste en la destrucción de la materia orgánica por medio de oxidación, con una mezcla constituida por ácido sulfúrico (H_2SO_4) y dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$). Para ello, 10,0 g de la muestra se situaron en 30,0 mL de la mezcla oxidante, para efectuar el proceso de digestión. Posteriormente, se realizó la titulación de los cationes de cromo reducidos mediante una solución de sulfato ferroso de amonio ($Fe(NH_4)(SO_4)_2$) de concentración 0,5 M, empleando el complejo de ortofenantrolina como indicador [2,3,17].

2.4 Extracción de la materia soluble

Para efectuar la extracción de la materia soluble en medio acuoso, como lo son las sales de naturaleza orgánica e inorgánica, los carbohidratos, aminoácidos, entre otras sustancias; se realizó una suspensión acuosa de 50,0 g de la muestra de suelo en agua destilada, con una proporción 1:5, en relación a la masa de la muestra con respecto al volumen de agua destilada. Esta suspensión fue sometida a agitación constante durante 24 h a una temperatura de 40 °C. A continuación, el sistema fue dejado en reposo durante 24 h y posteriormente filtrado a gravedad. El precipitado obtenido fue llevado a sequedad a una temperatura de 40 °C, para luego ser homogenizado mediante un proceso de macerado.

2.5 Extracción de las sustancias húmicas

El precipitado obtenido en el procedimiento anterior fue situado en una solución de hidróxido de sodio 0,1 M, en una proporción 1:5, con respecto a la masa de la muestra y el volumen de la solución, respectivamente. Este sistema fue sometido a agitación durante 24 h. Posteriormente, fue dejado en reposo durante 24 h y centrifugado durante 25 minutos a 3200 rpm. El sobrenadante obtenido se recolectó y el precipitado fue sometido a un procedimiento análogo al descrito con anterioridad,

en tres ocasiones adicionales. Posteriormente, se efectuó un procedimiento semejante reduciendo los tiempos de contacto de la muestra y la solución a 4 h, hasta la obtención de un sobrenadante de apariencia incolora.

El precipitado obtenido en la última centrifugación fue purificado mediante lavados con agua destilada, llevado a sequedad a 40 °C y homogenizado mediante un proceso de macerado.

El sobrenadante obtenido corresponde a una mezcla de AH y AF. Las dos primeras extracciones de estas sustancias fueron caracterizadas mediante análisis elemental de carbono, empleando un equipo ThermoFiningan Flash EA1112/CHN. Posterior a ello, las mezclas fueron acidificadas empleando una solución de ácido clorhídrico con una concentración 0,3 M, hasta la obtención de un pH inferior a 2. Este sistema fue dejado en reposo durante 24 h y posteriormente centrifugado bajo las condiciones descritas con anterioridad. El precipitado obtenido corresponde a los AH, los cuales fueron purificados mediante lavados con agua destilada y llevados a sequedad a 40 °C. El sobrenadante obtenido corresponde a los AF, que fueron neutralizados empleando una solución de hidróxido de sodio 0,1 M y posteriormente, purificados mediante un proceso de ultrafiltración con una membrana de 10 kDa a una presión de 4 atm. A continuación, fueron llevados a sequedad a una temperatura de 40 °C.

2.6 Elaboración de los sistemas de trabajo

Las mezclas establecidas para analizar las características estructurales de la Hu y sus interacciones se encuentran constituidas por ésta, las sustancias húmicas y moléculas de bajo peso molecular con los grupos funcionales característicos de la MOH, como lo son: el ácido carboxílico presente en el ácido acético, el grupo hidroxilo presente en el poliol sorbitol y el grupo hidroxilo fenólico, presente en el fenol. Cada una de las proporciones de las mezclas de las sustancias orgánicas se encuentran descritas en la tabla 2.

Con respecto a los detalles experimentales de la formación de las mezclas, en cada una de ellas se empleó el complejo Hu- arcilla en estado sólido y este fue incorporada a una solución que contenía de forma individual cada una de las sustancias orgánicas, este sistema fue sometido a agitación durante 5 minutos y posteriormente, las mezclas se secaron a una temperatura de 40 °C.

Tabla 2. Composición porcentual de las mezclas de Hu y las sustancias orgánicas.

Sustancia	Mezcla (%)							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Hu	50	50	50	50	50	50	50	20
AA	50							
Ph		50						
So			50					
AH				50		10	40	40
AF					50	40	10	40

Tabla 3. Caracterización fisicoquímica de las muestras de suelo.

Muestra	pH	Textura	CMO (%)	CIC (cmol+/kg)
S ₁	7,47	Franco - arcilloso	0,97	30,91
S ₂	6,74	Arcilloso	2,73	58,30
S ₃	7,66	Franco - arenoso	0,76	18,37

2.7 Análisis de las muestras

Las muestras fueron analizadas mediante espectroscopia de infrarrojo en la técnica de ATR empleando un equipo IRAffinity-1s espectrofotométrico de Shimadzu Co (Kyoto, Japón), con un cristal de SeZn. Debido a que el suelo es una muestra compleja, presenta abundantes absorciones en el espectro de infrarrojo en la región media, lo que genera dificultad para la identificación específica de las bandas de vibración fundamental, ante esta situación la interpretación cualitativa de los espectros fue desarrollada mediante el empleo de herramientas matemáticas, tal como el coeficiente de correlación de Pearson, R^2 , como índice de similitud espectral entre las sustancias húmicas y FEDS, para la resolución de las bandas de vibración en las mezclas de Hu y las sustancias orgánicas [1,22].

3. Resultados y discusión

3.1 Caracterización de las muestras de suelo

Los resultados de los análisis efectuados para caracterizar las propiedades de las tres muestras de suelo se encuentran en la tabla 3.

Con base en los resultados es posible establecer que las muestras de suelo S₁ y S₃ presentan un pH ligeramente básico, mientras que la muestra S₂ exhibe un pH ligeramente ácido. Con respecto al contenido de materia orgánica en las muestras, el contenido en los suelos S₁ y S₃ es deficiente, en

contraste con el establecido para el suelo S₂, que se encuentra en un rango medio. Los resultados de la capacidad de intercambio catiónico de los suelos se encuentran en concordancia con la relación entre la CIC y el contenido de materia orgánica en los suelos, debido a que el CMO de las muestras se encuentra en el siguiente orden creciente $S_3 < S_1 < S_2$, orden análogo al presente en la CIC, la que se encuentra en un rango medio para la muestra S₃ y alto para las muestras S₁ y S₂; con respecto a ello, es relevante mencionar que la muestra S₂ presenta una textura arcillosa y las arcillas presentan capacidad de intercambio catiónico, a causa de la presencia de la carga superficial generada por las sustituciones isomórficas en el material [4]. Con base en lo anterior, el contenido de arcillas en la muestra S₁ puede encontrarse también relacionado con la notable diferencia entre la CIC de este suelo y la muestra S₃, a pesar de que ambas presentan una cantidad similar en el contenido de materia orgánica.

3.2 Extracción de las sustancias húmicas

El proceso de extracción de las sustancias húmicas empleando una solución de hidróxido de sodio 0,1 M hasta la obtención de un sobrenadante incoloro fue llevado a cabo nueve veces en el caso de la muestra S₁, dieciocho veces en el caso de la muestra S₂ y seis veces para la muestra S₃. Este comportamiento presenta una correlación entre el contenido de materia orgánica y el número de extracciones necesarias para obtener un sobrena-

dante incoloro, puesto que el orden de CMO en las muestras corresponde a $S_2 > S_1 > S_3$, tal como ocurre con el número de extracciones; es relevante mencionar, que ello también se encuentra relacionado con la textura presente en cada muestra de suelo.

En el caso de la muestra de suelo S_2 , esta exhibe un comportamiento oscilatorio en su tonalidad desde la extracción número nueve hasta la extracción número dieciocho (figura 1), esta situación puede encontrarse asociada a la interacción entre la materia orgánica y las partículas coloidales en el suelo, debido a que los AH son sustancias relevantes en la formación de agregados estables, en los que actúan como agentes enlazantes de partículas como las arcillas [4].

En cuanto a la tonalidad de las extracciones, es posible evidenciar que, para cada muestra de suelo, la segunda extracción de AH y AF presenta una tonalidad más oscura que la primera; este suceso podría ser un indicativo de una mayor cantidad de componentes húmicos en la segunda extracción. Esta hipótesis fue evaluada mediante el análisis elemental de la primera y la segunda extracción, obteniendo los resultados presentes en la tabla 4, en esta es posible evidenciar que la coloración de las extracciones no se encuentra directamente relacionada, en todos los casos, con el porcentaje de carbono presente en la muestra y por extensión el contenido de MOH extraída.



Figura 1. Fotografías de las extracciones consecutivas de los AH y AF de las muestras de suelos. Extracciones número 1 a 9 de la muestra S_1 (a), de la muestra S_2 (b), 10 a 18 de la muestra S_2 (c) y 1 a 6 de la muestra S_3 (d).

Tabla 4. Análisis elemental de las extracciones de AH y AF.

Muestra	C, extracción 1 (%)	C, extracción 2 (%)
S_1	0,1586	0,1800
S_2	0,1526	0,1272
S_3	0,1826	0,1136

3.3 Análisis espectral de materia orgánica humificada

Las sustancias húmicas (Hu, AH y AF) de cada muestra de suelo fueron caracterizadas mediante FTIR en la técnica de ATR en la región del infrarrojo medio. Los espectros obtenidos se encuentran ilustrados en la figura 2.

En la figura 2 es posible evidenciar en los espectros de los complejos de Hu - arcilla, una banda de poca intensidad en la región cercana a $3650 - 3700 \text{ cm}^{-1}$ asociada a la vibración del enlace Si-O-H, característico de materiales inorgánicos como las arcillas; en la región entre 3600 y 3000 cm^{-1} la banda asociada a la vibración de tensión del enlace O-H característica de los alcoholes, los fenoles y los ácidos carboxílicos; en una frecuencia cercana a 1650 cm^{-1} se observa la banda de vibración del enlace C=O característico de las funciones como el ácido carboxílico, las cetonas y los ésteres; las bandas de intensidad débil y poco notorias en el espectro entre $2972 - 2857 \text{ cm}^{-1}$ son asociadas con el estiramiento C-H de los grupos alifáticos; en una región cercana a 1550 cm^{-1} se observa una banda asociada a la vibración de los grupos carboxilato provenientes de la desprotonación de los grupos ácido carboxílico; en la región aproximada a 1050 cm^{-1} la vibración del estiramiento asimétrico de los enlaces Si-O-Si, característica de los silicatos; entre 950 y 1000 cm^{-1} la banda de vibración del enlace C-O-C de los éteres como los polisacáridos y sus derivados; en el rango entre 600 y 920 cm^{-1} se encuentran bandas de poca intensidad, por lo general asociadas a la flexión de los enlaces constituyentes de los minerales en las arcillas [18, 23, 24].

Las bandas de vibración orgánicas presentes en el complejo de Hu y arcilla son concordantes con la composición establecida para la Hu, que es predominantemente constituida por derivados de lípidos, ceras, carbohidratos, péptidos y peptidoglicanos derivados de la lignina [10]. Es posible observar que los espectros de los complejos de la Hu y la arcilla de diferentes suelos exhiben similitud en las bandas de vibración y en la intensidad de estas, aspectos que son indicativos de la similitud estructural e idénticos grupos funcionales en las muestras de Hu-arcilla [23].

Con respecto al espectro de AHs y AFs, estos presentan las mismas bandas orgánicas encontradas en el complejo Hu-arcilla; no obstante, puede verse

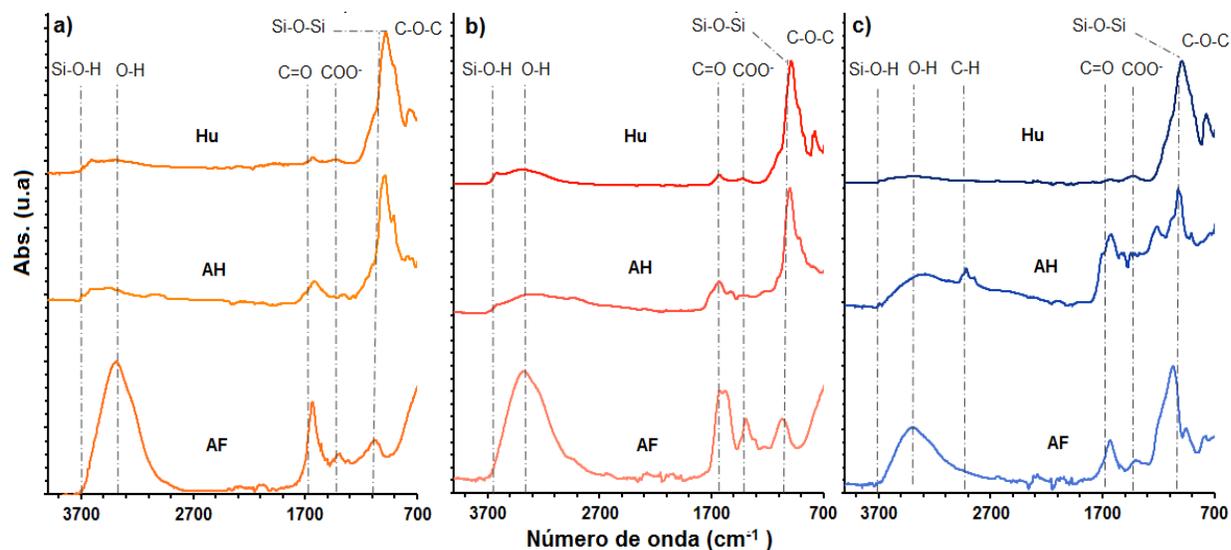


Figura 2. Espectros FT-IR de las sustancias húmicas de las muestras a) S₁, b) S₂ y c) S₃.

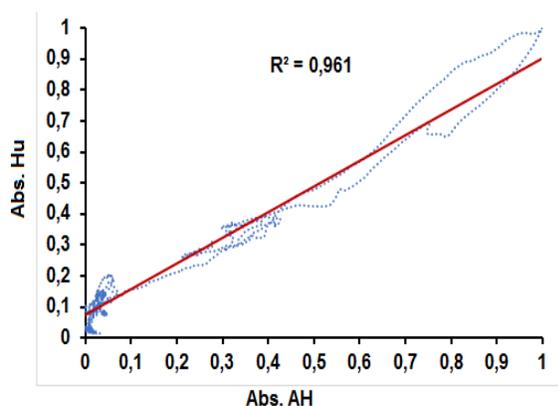


Figura 3. Comparación espectral de la Hu y los AH del suelo 1 mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Tabla 5. Coeficiente de correlación de Pearson de las sustancias húmicas.

Comparación espectral entre sustancias húmicas			R ²
Suelo 1			
Hu	AH		0,9610
Hu	AF		0,1084
Suelo 2			
Hu	AH		0,9078
Hu	AF		0,1342
Suelo 3			
Hu	AH		0,5458
Hu	AF		0,4286

que las intensidades relativas de estas distan considerablemente entre sí, observando en el espectro de los AF una intensidad mayor en la banda del enlace O-H con respecto a la exhibida por la Hu, esto concuerda con el hecho de que la última sustancia posee una menor reactividad química a causa de la pérdida de grupos reactivos, como los ácidos carboxílicos y fenoles, lo que conlleva a la disminución en la intensidad de la banda del hidroxilo en el espectro de infrarrojo [4]. A su vez, este hecho concuerda con la naturaleza insoluble de la Hu, explicada por Hayes y Clapp como el reflejo de que las superficies polares de la sustancia presentan una asociación íntima con las partículas inorgánicas del suelo, y el segmento hidrofóbico corresponde a la parte externa que interactúa con las moléculas de los disolventes [23].

Con el propósito de determinar un valor cuantitativo en la similitud espectral de las sustancias húmicas presentes en cada muestra de suelo, se empleó el coeficiente de correlación de Pearson, una de las gráficas obtenidas en este análisis se ilustra en la figura 3. Al efectuar un estudio análogo para la Hu y las demás sustancias húmicas, se obtuvieron los resultados contenidos en la tabla 5.

Los resultados evidencian que el complejo de Hu-arcilla presenta una mayor similitud estructural con los AH, obteniendo valores de R² en el orden de 0,900 para las muestras S₁ y S₂, hecho concordante con la descripción de la Hu como AH íntimamente asociados a partículas inorgánicas del suelo [11].

Con relación a la muestra S_3 , esta presenta un coeficiente de correlación del orden de 0,5 para los AH y 0,4 para los AF, valores que permiten establecer que la composición de la Hu de la muestra S_3 no se encuentra directamente relacionada con la de las demás sustancias húmicas, este hecho podría encontrarse asociado a los diferentes grados de descomposición que experimentan los AH, los AF y la Hu en el tiempo, puesto que esta última sustancia presenta resistencia a la descomposición [10].

3.3 Análisis espectral de las mezclas entre el complejo Hu-arcilla y las sustancias orgánicas

Con el objetivo de estudiar las interacciones presentes entre las sustancias orgánicas y la Hu, cada una de las mezclas establecidas previamente fue estudiada mediante ATR y los datos obtenidos fueron analizados empleando el algoritmo FEDS para la transformación matemática del espectro, basado en las transformaciones wavelet; obteniendo una mayor resolución de las bandas de vibración en el espectro y un número de onda definido para cada una de las vibraciones fundamentales correspondientes a los grupos funcionales característicos de las muestras [22].

Debido a que se deseaba analizar las interacciones intermoleculares presentes en las sustancias orgánicas y la Hu, es de especial interés examinar la banda de vibración asociada con el enlace O-H, debido a que esta presenta cambios espectrales notorios al encontrarse en su forma asociada mediante enlaces de hidrógeno, esto ocurre a causa de que la fortaleza del enlace disminuye al presentar una interacción de la forma O-H --- O, lo que se refleja en una disminución en el número de onda de la banda de vibración fundamental [14, 15, 22]. Por esta razón, el análisis espectral de las mezclas entre el complejo Hu-arcilla y las sustancias orgánicas se basó en la comparación de la posición de la banda asociada a la vibración fundamental del enlace O-H en FEDS. Los datos obtenidos en los espectros de las moléculas orgánicas de bajo peso molecular y los complejos Hu-arcilla se encuentran en la tabla 6. Con relación a los datos de número de onda obtenidos para las mezclas de los complejos de Hu-arcilla y las moléculas orgánicas humificadas y de bajo peso molecular, estos se encuentran contenidos en la tabla 7.

Tabla 6. Número de onda ($\tilde{\nu}$) de la banda del hidroxilo de las sustancias orgánicas de bajo peso molecular y de la Hu en diferentes suelos.

Sustancia orgánica	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)	Hu	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹)
AA	3024	S1	3527
So	3302	S2	3549
Ph	3255	S3	3421

Tabla 7. Número de onda de la banda del hidroxilo de las mezclas de Hu y sustancias orgánicas.

Mezcla *	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) S ₁	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) S ₂	$\tilde{\nu}$ (cm ⁻¹) S ₃
1	3495	3498	3414
2	3496	3387	3238
3	3261	3346	3356
4	3385	3535	3523
5	3458	3387	3473
6	3533	3387	3475
7	3375	3525	3458
8	3583	3514	3508

*La relación y componentes de las mezclas se encuentran detalladas en la tabla 2.

El análisis en la variación de la banda de vibración del O-H se examinó en función del corrimiento de la frecuencia de las mezclas con relación al presente en la Hu. En la mayor parte de las mezclas es posible observar un desplazamiento en el número de onda de la banda de vibración fundamental del hidroxilo hacia una frecuencia menor con respecto a la presente en la Hu, resultados que sugieren la formación de una interacción de enlace de hidrógeno entre la Hu, las moléculas de bajo peso molecular con los grupos característicos de las sustancias húmicas, los AH y los AF. Ello sugiere que la formación de agregados moleculares o estructuras supramoleculares en la MOH se debe primordialmente a los grupos hidroxilo, ácido carboxílico y fenol interactuando mediante enlaces de hidrógeno. No obstante, la magnitud del desplazamiento en la frecuencia no puede ser asociada en forma directa con la fortaleza del enlace de hidrógeno [14,26,27].

A su vez, resulta interesante la presencia de algunos valores de frecuencia de la banda del hidroxilo que no se encuentran en concordancia con la tendencia observada, los que pueden ser explicados a causa de que el enlace de hidrógeno es función de la geometría molecular, las condiciones de potencial

de hidrógeno presentes en el medio y las características de acidez de los grupos funcionales de las moléculas presentes en la mezcla, lo que puede influir en el desplazamiento en la frecuencia fundamental [14].

Los resultados obtenidos se encuentran en concordancia con las interacciones químicas propuestas comúnmente para las sustancias húmicas, puesto que estas han sido descritas como unidades estructurales asociadas primordialmente por enlaces de hidrógeno, redes entrecruzadas de estructura aromática y alifática sustituidas con grupos oxigenados de naturaleza ácida asociados mediante interacciones débiles, agregados supra-moleculares resultantes de interacciones como enlaces de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals e hidrofóbicas y sustancias con la presencia de radicales libres con la capacidad de enlazar moléculas de bajo peso molecular mediante enlaces de hidrógeno e interacciones apolares [5,8,9].

Es relevante mencionar que el enlace de hidrógeno puede ser también evidenciado mediante el desplazamiento a menores frecuencias de la banda del carbonilo, sin embargo, el análisis de esta se torna complejo en las muestras de Hu, a causa de los diversos grupos funcionales que esta posee con la presencia del carbonilo, como lo son los ácidos carboxílicos, los ésteres, las cetonas, entre otros grupos funcionales característicos de la MOH; cada uno de ellos genera una banda a diferente número de onda en el rango entre $1650 - 1710 \text{ cm}^{-1}$, lo que ocasiona dificultades en el correcto análisis del desplazamiento en la frecuencia de vibración. Adicional a esto, la presencia de carboxilatos (sales del ácido carboxílico), que generan bandas de absorción cercanas a 1550 y 1350 cm^{-1} , representa una dificultad adicional en el análisis del corrimiento de la banda asociada al grupo carbonilo [15,28].

4. Conclusiones

El análisis estructural de la Hu y sus interacciones con los demás componentes de la MOH y moléculas de bajo peso molecular puede ser llevado a cabo empleando los complejos resultantes de la asociación entre la Hu y la arcilla. Evidenciando en el estudio la similitud en la estructura y composición de los AH y la Hu, en contraste con la diferencia que esta presenta en relación con los AF. Además, los

desplazamientos en la frecuencia fundamental de la banda del hidroxilo sugieren una interacción débil de enlace de hidrógeno en la formación de agregados supramoleculares entre la Hu, AH, AF y la asociación con moléculas orgánicas de bajo peso molecular, interacciones generadas principalmente mediante los grupos funcionales ácido carboxílico, hidroxilo y fenol.

Agradecimientos

Autores agradecen a Mindtech s.a.s. y a la Universidad del Valle por los recursos suministrados en el marco de: Program for Scientific Knowledge Diffusion of Mindtech s.a.s. (PSKD 2016-2020)

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo en relación a la publicación.

Referencias

- [1] S. C. Du, J. Zhou. Evaluation of soil fertility using infrared spectroscopy: a review. *Environ Chem Lett*. 2009; 7 p 97 – 113.
- [2] A. Otto, M. J. Simpson. Analysis of soil organic matter biomarkers by sequential chemical degradation and gas chromatography – mass spectrometry. *J. Sep. Sci*. 2007; 30 p 272 – 282.
- [3] F. Prieto-García, J. Prieto-Méndez, O. A. Acevedo-Sandoval. Determination of organic matter by infrared spectroscopy on soil barley growers. *Asian Journal of Chemistry*. 2016; 12 p 2978 – 2804.
- [4] B. Zerpa, S. Joan. Estudio de los parámetros de humificación en suelos contaminados con residuos sólidos urbanos. Trabajo Especial de Grado presentado como credencial para Optar al Título de Licenciada en Química. Universidad de Carabobo. 2012.
- [5] P. MacCarthy, The principles of humic substances: An introduction to the first principle. *Soil science*. 2001; 166 (11) p 738 – 751.
- [6] M. Kalina, M. Klučáková, P. Sedláček. Utilization of fractional extraction for characterization of the interaction between humic acids and metals. *Geoderma*. 2013; 207 -208 p 92 – 98.
- [7] A. Manzak, C. Kuşun, Y. Yıldız. Characterization of humic acid extracted from aqueous solutions with polymer inclusion membranes. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*. 2017; 81 p 14 – 20.
- [8] W. Chavarriaga, A. García, N. Garcés. Fraccionamiento y dinámica de la materia orgánica en suelos de agroecosistemas andinos en el departamento de Caldas, Colombia. VIII Congreso Ecuatoriano de la Ciencia del Suelo. 2015.

- [9] R. L. Wershaw. Application of a membrane model to the sorptive interaction of humic substance. *Environmental Health Perspectives*. 1989: 83 p 191 – 203.
- [10] M. H. Hayes, R. Mylotte, R. S. Swift. Humin: its composition and importance in soil organic matter. *Advances in Agronomy*, Elsevier. Chapter two. 2017. p. 42 – 138.
- [11] J. A. Rice, P. MacCarthy. Disaggregation and characterization of humin. *The Science of the Total Environment*. 1992: 117/18 p 83 – 88.
- [12] J. Rice, P. MacCarthy. Isolation of humin by liquid – liquid partitioning. *The Science of the Total Environment*. 1989: 81/82 p 61 – 69.
- [13] M. Nocita, A. Stevens, B. van Wesemael. Soil spectroscopy: an alternative to wet chemistry for soil monitoring. *Advances in Agronomy*. 2015: 132 p 139 – 159.
- [14] M. Gorman. The evidence from infrared spectroscopy for hydrogen bonding: A case history of the correlation and interpretation of data. *J. Chem. Educ.* 1957: 34 (6) p 304 – 306.
- [15] P. Excoffon, Y. Marueha. Infrared spectra of H-bonded systems: saturated carboxylic acids dimers. *Spectrochimica Acta*. 1972: 28 A p 269 – 283.
- [16] R. Rana, K. Herz, H. Bruelheide, *et. al.* Leaf attenuated total reflection Fourier transform infrared (ATR-FTIR) biochemical profile of grassland plant species related land-use intensity biochemical profile of grassland plant species related to land-use intensity. *Ecological Indicators*. 2018: 84 p 803 – 810.
- [17] V. Bellon-Maurel, A. McBratney. Near-infrared (NIR) and mid-infrared (MIR) spectroscopic techniques for assessing the amount of carbon stock in soil – critical review and research perspectives. *Soil Biology & Biochemistry*. 2011: 43 p 1398 – 1410.
- [18] T. A. Lerma, E. M. Combatt, M. S. Palencia. Efecto de la temperatura sobre coloides de suelos agrícolas mediante dispersión dinámica de la luz. *Revista de Ciencias Agrícolas*. 2015: 32 (2), p 94 – 103.
- [19] E. Combatt, T. Mercado, G. Palencia. Alteración química de la solución de un suelo sulfatado ácido, con enclamiento y lavado en columna disturbadas. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica*. 2009: 12 (1) p 101 – 111.
- [20] K. Borja, J. Mercado, E. M. Combatt. Dispersantes químicos y cuantificación de fracciones texturales por los métodos de Bouyoucos y pipeta. *Acta Agron.* 2015: 64 (4) p 308 – 314.
- [21] T. A. Lerma, M. Palencia, E. M. Combatt. Soil polymer conditioner base don montmorillonite-poly(acrylic acid) composites. *J. Appl. Polym. Sci.* 2018: 135 p 46211.
- [22] M. Palencia. Functional transformation of Fourier-transform mid-infrared spectrum for the improving of spectral specificity by simple algorithm based on wavelet-like functions. *Journal of Advanced Research*. 2018: 14 p 53–62.
- [23] H. E. Cortés, M. I. Ballesteros, A. M. Zamudio. Optimización de una metodología para la extracción de la humina de un oxisol de Colombia. Fraccionamiento y caracterización fisicoquímica. *Rev. Colomb. Quím.* 2007: 36 (3) p 335 – 348.
- [24] L. Paoloni, A. Patti, F. Mangano. The hydrogen bond with carbonyl groups: theoretical study of the correlation between the X-H stretching frequency shift and the C=O group properties. *Journal of Molecular Structure*. 1975: 27 p 123 – 137.
- [25] P. Krishnamurthi, H. Ramalingam, K. Raju. FTIR studies of hydrogen bonding interaction between the hydroxyl and carbonyl liquids. *Advances in applied science research*. 2015: 6 (12) p 44 – 52.
- [26] C. Zhang, D. Zhang, Z. Xiao, *et. al.* Characterization of humins from different natural sources and the effect on microbial reductive dechlorination of pentachlorophenol. *Chemosphere*. 2015: 131 p 110 – 116.
- [27] G. E. Shaunmann. Soil organic matter beyond molecular structure. Part I: macromolecular and supramolecular characteristics. *J. Plant. Nutr. Soil Sci.* 2006: 169 p 145 – 156.
- [28] U. Baes, P. R. Bloom. Diffuse reflectance and transmission Fourier transform infrared (DRIFT) spectroscopy of humic and fulvic acids. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 1989: 53 p 695 – 700.