

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA DE LOS  
ÁCIDOS HÚMICOS DE UN SUELO ANDISOL DEL DEPARTAMENTO DEL  
CAUCA**

**CARMEN STELLA MOSQUERA VIVAS**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2006**

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LA ESTRUCTURA DE LOS  
ÁCIDOS HÚMICOS DE UN SUELO ANDISOL DEL DEPARTAMENTO DEL  
CAUCA**

**CARMEN STELLA MOSQUERA VIVAS**

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial  
para optar el título de Químico**

**Directora: ISABEL BRAVO REALPE M.Sc**

**Asesor: Eddy W. Hansen  
(Profesor de la Universidad de Oslo)**

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y EXACTAS DE LA EDUCACIÓN  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
POPAYÁN  
2006**

***“Señores, aprendamos a soñar y quizás,  
entonces, aprendamos la verdad”***

***August Kekulé 1890***

**Nota de Aceptación**

---

---

---

---

---

---

**Directora: Isabel Bravo Realpe M.Sc**

---

**Jurado: Jaime Martin Franco Ph.D**

---

**Jurado: Fabio Antonio Cabezas Ph.D**

**Fecha de sustentación: Popayán, Febrero 17 de 2006.**

## **DEDICATORIA**

*A mi madre, quien con su esfuerzo y fortaleza permitió terminar esta etapa de mi vida.*

*A Diego, quien con su amor y compromiso con un nuevo amanecer, me permitió redimensionar mi ser.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi madre y familia en general por su apoyo y colaboración en la concreción de mis objetivos y aspiraciones

A la profesora Isabel Bravo y profesores del departamento de química por sus enseñanzas y aportes a mi formación académica y profesional.

A el profesor Eddy W. Hansen, Per Olav, Nelson, Sulma Muñoz y Cruz Marina Torres por su valiosa colaboración.

A mis compañeras y compañeros del programa de química, quienes me apoyaron y ayudaron en el desarrollo de mi carrera.

A la Juventud, quien me permitió abrir los horizontes de mi vida.

## CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>14</b>
<b>1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....</b>	<b>16</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>3. FUNDAMENTO TEÓRICO .....</b>	<b>19</b>
<b>3.1 SUELOS ANDISOLES.....</b>	<b>20</b>
<b>3.2 MATERIA ORGÁNICA.....</b>	<b>21</b>
3.2.1 Importancia de la materia orgánica:.....	22
3.2.2 Formación bioquímica del humus: .....	23
3.2.3 Sustancias húmicas: .....	26
<b>3.3 ÁCIDOS HÚMICOS .....</b>	<b>28</b>
<b>3.4 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS.....</b>	<b>33</b>
3.4.2 Espectroscopía infrarroja .....	35
3.4.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear .....	36
3.4.2.1 Espectroscopía <sup>13</sup> C RMN .....	38
<b>4. METODOLOGÍA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA.....</b>	<b>40</b>
<b>4.2. TOMA DE MUESTRA .....</b>	<b>40</b>
<b>4.3. CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL SUELO.....</b>	<b>41</b>
4.3.1. Parámetros físicos .....	41
4.3.1.1. Humedad.....	41
4.3.1.2. Densidad real .....	41
4.3.1.3. Textura .....	42
4.3.2. Parámetros químicos .....	42
4.3.2.1. pH.....	42
4.3.2.2. Determinación de la materia orgánica.....	42
4.3.2.3. Acidez y aluminio intercambiable .....	43
4.3.2.4. Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl.....	44
4.3.2.5. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y bases de cambio.....	44
4.3.2.6. Determinación de fósforo .....	45
<b>4.4. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS.....</b>	<b>45</b>
4.4.1. Fraccionamiento de la muestra.....	45
<b>4.5. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS .....</b>	<b>54</b>

4.5.1. Pruebas de solubilidad.....	54
4.5.2. Valoración de la relación E4/E6.....	54
4.5.3. Análisis por espectroscopía infrarroja.....	54
4.5.4 Análisis por <sup>13</sup> C RMN.....	54
4.5.1. Acetilación de los ácidos húmicos .....	55
4.5.2 Hidrólisis de los ácidos húmicos: .....	56
<b>5. ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1. ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL SUELO .....</b>	<b>60</b>
<b>5.2 OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS.....</b>	<b>63</b>
5.2.1 Separación de la materia orgánica humificada (MOH) de la materia orgánica fresca (MOF).....	63
5.2.2 Extracción y separación de las sustancias húmicas .....	65
<b>5.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS.....</b>	<b>66</b>
5.3.1 Acetilación de los ácidos húmicos .....	71
5.3.2 Hidrólisis básica y ácida de los ácidos húmicos .....	79
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>100</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>102</b>



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Comparación de pseudo estructuras con estructuras moleculares.....	32
<b>Tabla 2.</b> Desplazamientos químicos.....	39
<b>Tabla 3.</b> Análisis físicos y químicos del suelo Andisol.....	61
<b>Tabla 4.</b> Valores de referencia reportados en la literatura.....	63
<b>Tabla 5.</b> % Rendimiento con el método granulométrico para separar la MOH de la MOF en un suelo Andisol.....	64
<b>Tabla 6.</b> %Corg y %M.O del suelo Andisol y de la MOH del mismo suelo.....	65
<b>Tabla 7.</b> %Corg y %M.O de los ácidos húmicos sin purificar.....	65
<b>Tabla 8.</b> Propiedades de los ácidos húmicos extraídos de un suelo Andisol.....	67
<b>Tabla 9.</b> Relación E4/E6 de los compuestos AH, AH <sub>3</sub> , AH <sub>3A</sub> , AH <sub>3B1</sub> .....	71
<b>Tabla 10.</b> Distribución de intensidad de RMN <sup>13</sup> C de dos compuestos AH, AH <sub>3</sub> ...78	
<b>Tabla 11.</b> Relación E4/E6 de los compuestos AH <sub>6</sub> , AH <sub>7</sub> y AH <sub>9</sub> a diferentes tiempos de reacción.....	79
<b>Tabla 12.</b> Solubilidad de los compuestos AH <sub>6(1,2,3,4)</sub> .....	84
<b>Tabla 13.</b> Relación E4/E6 de los compuestos AH <sub>6</sub> , AH <sub>7</sub> y AH <sub>9</sub> .....	84
<b>Tabla 14.</b> Relación E4/E6 para los compuestos AH <sub>10(1,2,3,4)</sub> y AH <sub>11(1,2,3,4)</sub> .....	87
<b>Tabla 15.</b> Relación E4/E6 del compuesto AH <sub>10(5)</sub> .....	91
<b>Tabla 16.</b> Distribución relativa de la intensidad del carbón para los compuestos AH <sub>6(5)</sub> , AH <sub>10(5)</sub> y AH <sub>5</sub> proveniente de los espectro de <sup>13</sup> C RMN.....	94

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la fracción organomineral.....	26
<b>Figura 2.</b> Estructura hipotética de Dragunov de ácidos húmicos por Kononova..	30
<b>Figura 3.</b> Estructura hipotética de los ácidos húmicos por Stevenson.....	30
<b>Figura 4.</b> Estructura esquemática de los ácidos húmicos (A) y fúlvicos (B) (según Andreux y Munier-Lamy, 1994).....	31
<b>Figura 5.</b> Estados de espín de los núcleos atómicos.....	37
<b>Figura 6.</b> Espectro IR de los ácidos húmicos.....	68
<b>Figura 7.</b> RMN <sup>13</sup> C de los ácidos húmicos.....	70
<b>Figura 8.</b> Espectro IR del compuesto AH <sub>3</sub> .....	72
<b>Figura 9.</b> Espectro IR del compuesto AH <sub>3A</sub> .....	74
<b>Figura 10.</b> Espectro IR del compuesto AH <sub>3B1</sub> .....	75
<b>Figura 11.</b> Posible reacción de acetilación para los ácidos húmicos.....	76
<b>Figura 12.</b> Espectro <sup>13</sup> C RMN del compuesto AH <sub>3</sub> .....	77
<b>Figura 13.</b> Espectro RMN <sup>13</sup> C de dos compuestos AH, AH <sub>3</sub> .....	78
<b>Figura 14.</b> Gráfica relación E4/E6 vs. Tiempo de reacción en la hidrólisis básica.....	80
<b>Figura 15.</b> Espectros IR del compuesto AH <sub>6</sub> a diferentes tiempos de reacción....	81
<b>Figura 16.</b> Espectro IR del compuesto AH <sub>6 (5)</sub> .....	85
<b>Figura 17.</b> Espectros IR del compuesto AH <sub>7 (5)</sub> y AH <sub>9 (5)</sub> .....	86
<b>Figura 18.</b> Gráfica relación E4/E6 vs. Tiempo de reacción para la hidrólisis ácida.....	88
<b>Figura 19.</b> Espectros IR de los compuestos AH <sub>10(1,2,3,4)</sub> .....	88

<b>Figura 20.</b> Espectro IR del compuesto AH <sub>10(5)</sub> .....	92
<b>Figura 21.</b> Espectros <sup>13</sup> C RMN de los compuestos AH <sub>6(5)</sub> y AH <sub>10(5)</sub> .....	93
<b>Figura 22.</b> Espectros IR y <sup>13</sup> C RMN del compuesto AH <sub>5</sub> .....	95
<b>Figura 23.</b> Representación esquemática de la intensidad de las bandas en los espectros <sup>13</sup> C RMN para los compuestos AH <sub>6(5)</sub> , AH <sub>10(5)</sub> y AH <sub>5</sub> .....	96
<b>Figura 24.</b> Intensidad relativa de los compuestos AH <sub>6(5)</sub> , AH <sub>10(5)</sub> y AH <sub>5</sub> .....	97
<b>Figura 25.</b> Estructura hipotética para los ácidos húmicos jóvenes.....	99

## LISTA DE DIAGRAMAS

<b>Diagrama 1.</b> Formación de los ácidos húmicos.....	24
<b>Diagrama 2.</b> Método granulométrico para el fraccionamiento de la materia orgánica.....	47
<b>Diagrama 3.</b> Método densimétrico para el fraccionamiento de la M.O.H.....	48
<b>Diagrama 4.</b> Extracción de las sustancias húmicas.....	:50
<b>Diagrama 5.</b> Floculación de las arcillas.....	51
<b>Diagrama 6.</b> Separación de los ácidos húmicos y fúlvicos.....	52
<b>Diagrama 7.</b> Purificación de los ácidos húmicos.....	53
<b>Diagrama 8.</b> Acetilación de los ácidos húmicos.....	56
<b>Diagrama 9.</b> Hidrólisis básica de los ácidos húmicos.....	57
<b>Diagrama 10.</b> Hidrólisis ácida de los ácidos húmicos.....	59
<b>Diagrama 11</b> Representación esquemática de los diferentes productos obtenidos en la acetilación, hidrólisis básica, hidrólisis ácida y tratamiento con etanol.....	70

## ACRONIMOS

<b>AH</b>	Ácidos húmicos
<b>MO</b>	Materia orgánica
<b>MOL</b>	Materia orgánica libre
<b>MOF</b>	Materia orgánica fresca
<b>MOH</b>	Materia orgánica humificada
<b>RMN</b>	Resonancia magnética nuclear
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>TF</b>	Transformada de Fourier
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>CIC</b>	Capacidad de intercambio catiónico
<b>%T</b>	Porcentaje de transmitancia
<b>SH</b>	Sustancias húmicas

## RESUMEN

La caracterización preliminar de la estructura de los ácidos húmicos de un suelo Andisol del departamento del Cauca, pretende continuar con la línea de estudio propuesta por el grupo de investigación de Agroquímica, en sustancias húmicas de suelos Andisoles ubicados en el municipio de Cajibío.

El departamento del Cauca, cuyo sustento principal es la agricultura presenta diversidad de suelos y por ende de cultivos, donde la zona rural del municipio de Cajibío se caracteriza por presentar suelos con alto contenido de materia orgánica y acidez muy fuerte que impide un adecuado proceso de mineralización y humificación, afectando notablemente la producción agrícola y el medio ambiente. Además en la mayoría de cultivos utilizan apreciables cargas de agroquímicos que afectan las propiedades normales de estos suelos. Por esto es importante realizar estudios que conduzcan al entendimiento de la evolución y la interacción de la materia orgánica, específicamente los ácidos húmicos, en dichos suelos.

Los ácidos húmicos se extrajeron de la materia orgánica humificada (M.O.H), la cual se obtuvo mediante separación granulométrica y densimétrica, a través de una extracción sucesiva, empleando tres soluciones básicas: tetraborato de sodio, pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio todas a una concentración 0.1N. La purificación de dichos compuestos orgánicos se realizó utilizando la combinación de varias metodologías como: centrifugación a alta velocidad, tratamiento con ácido clorhídrico-fluorhídrico para romper las uniones con compuestos inorgánicos y diálisis para eliminar la solución de NaOH utilizada en la solubilización de los ácidos húmicos. Posteriormente se liofilizó las muestras con el fin de obtenerlas en estado sólido y así con el uso de diferentes técnicas analíticas como espectroscopía infrarroja, ultravioleta-visible y resonancia magnética nuclear, determinar de forma preliminar su estructura.

Para una mayor información sobre la estructura de los ácidos húmicos se realizó una acetilación, una hidrólisis básica y ácida para aislar y analizar mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear, espectroscopía infrarroja y ultravioleta-visible los diferentes productos y cambios obtenidos. Y de esta manera contar con la información necesaria para la caracterización preliminar de la estructura y el comportamiento de los ácidos húmicos en diferentes soluciones o ambientes.

## ABSTRACT

A preliminary characterization of the structure of humic acids from a Andisol soil from the department of Cauca is presented. The intention is to continue the investigation in humic substances from Andisol soils located in the municipality of Cajibío, as proposed by the Agrochemical group of investigation.

The department of Cauca, which is mainly agricultural, presents a diversity of soils and therefore of different cultivations. The rural zone of the municipality of Cajibío is characterized by soils with a high content of organic matter, and with high acidity. This impedes an adequate processing of mineralization and humification, which notably affects the agricultural production, as well as the environment. In addition, the majority of farmers use significant quantities of agrochemicals, which affect the properties of these soils. It is of importance to expand our knowledge on these matters, so that we can improve our understanding regarding both the evolution, as well as the interaction of organic matter. This concerns, in particular, the interaction of humic acids within these soils.

The humic acids are extracted from humified organic matter (H.O.M) by granulometric and densimetric separation, followed by successive extractions, employing three basic solutions: sodium tetraborate, sodium pyrophosphate and sodium hydroxide. All solutions have a concentration of 0.1N. The purification of humic acids will be carried out by combining several methods, like: high speed centrifugation, processing with acid hydrochloric-fluorhydric (to break the interaction with inorganic compounds) and dialysis (for 24-48 hours) employing membranes of cellulose (12000 Daltons) that remove the NaOH utilized for the solubilization of the humic acids. Subsequently, the samples will go through a freeze dryer process in order to transform the liquid into a solid morphology, which is more suitable for structural analysis, using spectroscopic techniques (IR, UV and NMR).

To obtain additional structural information, an acetylation and a basic hydrolysis may be carried out in order to isolate and to analyze the products and to probe the changes obtained by means of NMR, UV and IR spectroscopy. In this manner one obtains some preliminary information regarding molecular structure, as well as other properties of the humic acid in different solutions or environments.

## 1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Colombia es un país cuya economía se basa principalmente en el sector agrícola, en donde el desarrollo científico y tecnológico hasta ahora alcanzado, sólo ha permitido en una mínima escala avanzar en el entendimiento de los diferentes procesos químicos, físicos y biológicos que ocurren en nuestros suelos, aplicando los diferentes desarrollos generados a nivel internacional, que constituye el grueso de esta actividad en el orden nacional.

Uno de los componentes que juega un papel esencial en el mantenimiento y productividad de los suelos es la materia orgánica, ampliamente utilizada en casi todos los cultivos, sin un estudio previo de sus beneficios, ocasionando al mismo tiempo perjuicios en las propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo, debido a su mal manejo y abuso.

Toda la variedad de sustancias orgánicas del suelo puede ser sistematizada en dos grupos fundamentales: las materias orgánicas de naturaleza individual y las sustancias húmicas propiamente dichas. Este último constituye la porción principal de la materia orgánica del suelo, hasta el 85-95 % y corresponde a los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas.

Los ácidos húmicos juegan un rol importante en las reacciones agrícolas y ambientales, influyendo sobre propiedades físicas, químicas y biológicas del suelo. La información sobre su estructura es vital para entender su reactividad con los contaminantes orgánicos e inorgánicos. Sin embargo, debido a su complejidad y heterogeneidad, la determinación estructural se ha dificultado. Los análisis clásicos elementales y técnicas químicas de degradación solo han permitido una información limitada sobre los posibles constituyentes químicos y los bloques de construcción de los ácidos húmicos.

La zona rural del municipio de Cajibío se caracteriza por presentar suelos con alto contenido de materia orgánica y acidez muy fuerte que impide un adecuado proceso de mineralización y humificación. Además en la mayoría de cultivos utilizan apreciables cargas de agroquímicos que afectan las propiedades normales de estos suelos. Se carece de estudios que conduzcan al entendimiento de la evolución y la interacción de la materia orgánica, específicamente los ácidos húmicos, en dichos suelos. Para entender la importancia de su papel en las



reacciones agrícolas y ambientales, es fundamental tener una idea clara del tipo de estructura molecular, ya que esta varía con el origen del suelo y otros factores ambientales, pero no existen estudios tendientes a esta clarificación como sí se cuentan con estudios de los otros dos grupos de sustancias húmicas como son los ácidos fúlvicos y huminas

Las consideraciones anteriores motivaron el desarrollo de este proyecto que pretende una caracterización preliminar de la estructura de los ácidos húmicos provenientes de un suelo Andisol del municipio de Cajibío, con el fin de conocer el comportamiento químico y físico de dichas sustancias en diferentes medios de reacción y así aportar al desarrollo científico de nuestro país y al entendimiento de las funciones de los ácidos húmicos en nuestros suelos, para contribuir positivamente en el marco de soluciones a la problemática del sector agrícola.

## **2. OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Caracterizar por espectroscopía de IR-TF, UV-Visible y RMN  $^{13}\text{C}$  los ácidos húmicos provenientes de un suelo Andisol.

### **ESPECÍFICOS**

- Caracterizar física y químicamente el suelo Andisol del municipio de Cajibío.
- Obtener los ácidos húmicos de un suelo Andisol, mediante una extracción secuencial con soluciones de Tetraborato de Sodio, Pirofosfato de Sodio e Hidróxido de Sodio.
- Determinar los componentes químicos presentes en los ácidos húmicos
- Evaluar los cambios estructurales de los ácidos húmicos mediante una acetilación e hidrólisis.

### 3. FUNDAMENTO TEÓRICO

El suelo es un sistema complejo en donde coexisten en estrecho equilibrio tres fases: una fase sólida, una líquida y una gaseosa.

La fase sólida de la mayoría de los suelos está constituida principalmente por sustancias inorgánicas de diferente composición química. Algunas de ellas son mezclas de compuestos a las que se denominan rocas, cuya meteorización conduce a los minerales primarios y secundarios formadores del suelo.

Se acostumbra definir como suelo a la capa superficial no consolidada de la superficie terrestre, la que está formada predominantemente por compuestos inorgánicos –hasta más del 99%–, con un porcentaje variable de sustancias orgánicas. Existen suelos orgánicos, los que corrientemente tienen una porción apreciable de componentes inorgánicos; se trata, en todo caso, de suelos que son mucho menos comunes que los primeros.

El análisis químico elemental de los suelos es un poderoso instrumento para su caracterización y comportamiento a largo plazo. Aunque esta información no sea de utilidad para estimar la fertilidad de los mismos, sí se necesita para los estudios de formación de ellos. Al desarrollarse los suelos, comúnmente ocurre un enriquecimiento de materia orgánica y la pérdida de diferentes elementos de mayor solubilidad que otros.

A la fase líquida del suelo también se acostumbra llamarla “solución del suelo”. Se define como una solución que casi posee equilibrio de electrolitos y que ocurre en condiciones de suelos no saturados por agua. Esta solución es de gran importancia para la nutrición de las plantas. Mientras que la fase gaseosa varía bastante en los suelos y comúnmente ocupa volúmenes que oscilan de cero a 45% del volumen total de ellos, encontrándose varios equilibrios líquido-gas, como la disolución del  $\text{CO}_2$  en la solución del suelo, formándose carbonato y carbonato ácido, aniones de gran importancia que aumentan fuertemente el poder solvente de la solución (1).

### 3.1 SUELOS ANDISOLES

Los Andisoles colombianos están ampliamente distribuidos en la región Andina del país, especialmente en la cordillera Central. En las cordilleras Occidental y Oriental también se presentan, pero comparativamente con la Central, en menor proporción. Las características generales y dominantes del medio natural donde se presentan estos suelos están influenciadas por la presencia de cenizas volcánicas, especialmente en aquellas zonas muy húmedas y pluviales, que constituyen pisos altitudinales que varían entre el Premontano (24°C) hasta el Montano (6-12°C) y donde los regímenes de humedad del suelo son muy altos. Los materiales orgánicos se presentan en cantidades muy altas (1.5-6% C.O). La erosividad varía de acuerdo con las cordilleras, predominando la media y alta en la Central y Occidental y las muy bajas en la Oriental.

El material parental predominante de los Andisoles del país es el piroclástico y fundamentalmente el de las cenizas volcánicas.

La transformación mineral se centra fundamentalmente, en la alteración de los materiales vítreos a alófanos con tendencia a aquellas de bajo grado de ordenamiento, dado que la gibsita e imogolita son muy escasas. El resultado de este proceso se constata en su morfología caracterizada por manifestar horizontes A espesos (30 – 50 cm aproximadamente), color pardo a pardo amarillento, estructura grumosa y granular fina, alta porosidad total, densidades aparentes bajas, estabilidad estructural alta, permeabilidad y movimiento del agua altos por lo cual las pérdidas de elementos también lo son, altos contenidos de materiales orgánicos que tienden a favorecer la formación de complejos Al-humus.

Dentro de las características químicas resaltan los valores de pH ácidos y ligeramente ácidos, las bajas saturaciones de bases, las altas capacidades de intercambio, la alta retención fosfórica, al igual que los valores altos en materiales orgánicos, con dominancia de compuestos de bajo grado de polimerización y abundantes huminas.

Las características y propiedades de los Andisoles y su localización, muchas veces en condiciones de pendientes pronunciadas y alta humedad, los hace susceptibles a la degradación estructural y a la erosión en sus diferentes manifestaciones, en especial cuando se han eliminado la cobertura del bosque o el sombrío en los cafetales.

Otros tipos de suelos pueden clasificarse bajo parámetros similares a los Andisoles, tales como los Podsoles o los Inceptisoles, sin embargo se han establecido criterios físicos, químicos y de campo seguros para diferenciarlos, aparte de la evidencia de la geografía del área (2).

### **3.2 MATERIA ORGÁNICA**

La materia orgánica está constituida por los compuestos de origen biológico que se encuentran en el suelo. El edafón consiste en los organismos vivientes del suelo: o sea flora y fauna. El humus está compuesto por los restos postmortem de vegetales y animales que, depositados en el suelo son constantemente sometidos a procesos de descomposición, transformación y resíntesis.

El concepto sobre el humus componente del suelo difiere un poco dentro de unos autores: Scheffer y Ulrico, Stevenson y Kokonova lo definen como la totalidad de restos postmortem presentes en el suelo; Mcloren y Peterson lo describen como el conjunto de aquellos componentes difícilmente mineralizables que se acumulan en el suelo.

Según la recomendación de la Soil Science Society of America, la materia orgánica del suelo se define en los términos siguientes “ fracción orgánica del suelo que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, tejidos y células de organismos que viven en el suelo y sustancias producidas por lo habitantes del suelo”. Esta fracción se determina en general en suelos que pasan por un tamiz con malla de 2.00 mm. En esta definición – aceptada por muchos edafólogos -, el concepto de materia orgánica es una categoría muy amplia que incluye tanto a materiales muy poco alterados como aquellos otros que si han experimentado profundos cambios en el suelo.

La parte más estable de esta materia orgánica del suelo se llama humus, la que la misma sociedad ya citada la define como “ la fracción mas o menos estable de la materia orgánica del suelo, la que se obtiene después que se ha descompuesto la mayor parte de las sustancias vegetales y animales añadidas al suelo”.

En todo caso, la fuente originaria de la materia orgánica y del humus está formada por los residuos animales y, especialmente, vegetales que cubren el suelo. La vegetación consta de tallos, hojas, flores y frutos, los que al depositarse en la superficie del suelo constituyen la hojarasca o mantillo; cada uno de los componentes tiene una composición química específica. En la mineralización, los

residuos sufren un proceso de degradación o descomposición hasta los componentes elementales de las proteínas, carbohidratos y otros. Los productos resultantes pueden ser objeto de nuevos procesos de resíntesis y polimerización, dando lugar a nuevos agregados químicos que reciben el nombre de ácidos húmicos que poseen características y propiedades específicas; este proceso recibe el nombre de humificación.

### **3.2.1 Importancia de la materia orgánica:**

La importancia de agregar materia orgánica para mejorar la productividad del suelo fue detectada hace milenios por los agricultores; de modo que es una práctica muy antigua.

En general, la fracción orgánica del suelo tiene un papel muy importante: regula los procesos químicos que allí ocurren, influye sobre las características físicas y es el centro de aproximadamente todas las actividades biológicas en el mismo, incluyendo las de la microflora, las de la fauna y hasta las del sistema de raíces de plantas superiores.

Entre los procesos químicos de importancia en los que interviene la materia orgánica, se pueden mencionar:

- Suministro de N, P, S y micronutrientes por la mineralización.
- Capacidad buffer del suelo.
- La capacidad de cambio catiónico de los suelos, porque permite retener las bases de cambio y disponerlas a la solución del suelo.
- La capacidad de intercambio aniónico, donde se acumulan nitratos, fosfatos y sulfatos.
- Regula los niveles de disponibilidad de nutrientes.
- Inactiva plaguicidas mediante la adsorción.
- Favorece la formación de agregados individuales en la estructura del suelo.

- Permite un uso más eficiente del agua.

En resumen, la importancia de la materia orgánica se explica por la influencia que ésta tiene sobre las propiedades físicas químicas y biológicas del suelo (3).

### **3.2.2 Formación bioquímica del humus:**

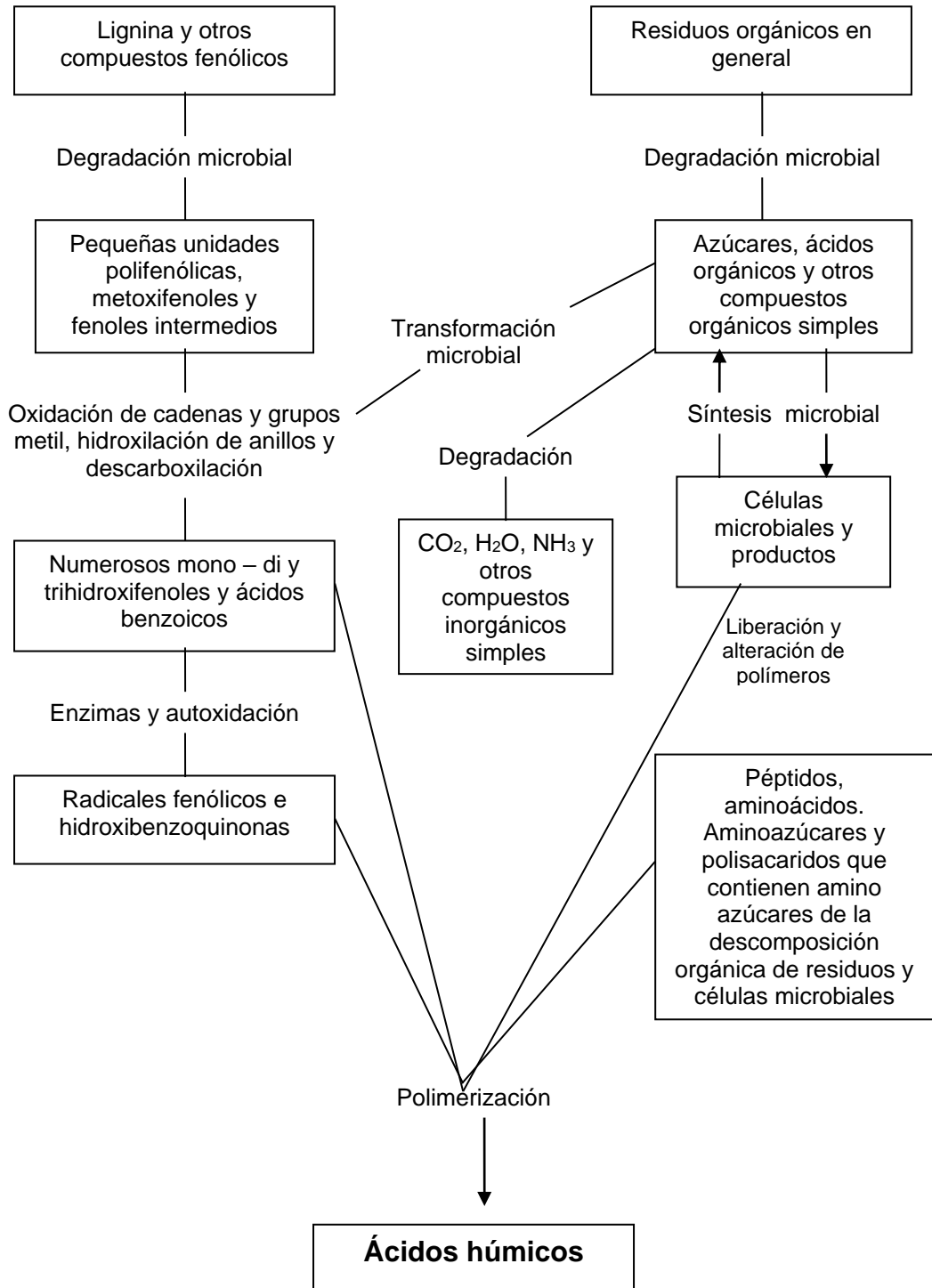
La materia orgánica del suelo, contiene dos tipos de compuestos, sustancias no humificadas y residuos humificados de tejidos de plantas y animales. Lo anterior está representado por compuestos orgánicos bien conocidos, incluyendo carbohidratos, grasa, ceras y proteínas.

El material humificado, el cual representa la fracción más activa del humus, consiste de una serie de ácidos con alto peso molecular, amarillos u oscuros, polielectrolitos conocidos como sustancias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas). Como nota, estas sustancias son formadas por reacciones de síntesis secundaria y tienen propiedades muy diferentes respecto a los biopolímeros de organismos vivos, incluyendo la lignina de plantas mayores.

Es generalmente aceptado que los ácidos húmicos y fúlvicos son formados por un proceso de varias etapas que incluyen: a) descomposición de todos los compuestos de la planta, incluyendo la lignina, a simples monómeros; b) metabolismo de los monómeros con un incremento de la biomasa del suelo; c) reciclar el carbón de la biomasa (y N) con síntesis de nuevas células y d) polimerización de los monómeros en polímeros de alto peso molecular.

A través de muchos tipos de reacciones se puede obtener la producción de pigmentos oscuros (ejemplo los ácidos húmicos), la principal vía parece ser mediante reacciones de condensación involucrando polifenoles y quinonas. Donde, acorde con los conceptos presentados, los polifenoles se derivan de las plantas (ejemplo la lignina) o por la síntesis de microorganismos, convirtiéndose enzimáticamente a quinonas, las cuales sufren una condensación o combinación con compuestos amino para formar polímeros que contienen nitrógeno. Un esquema para la formación de ácidos húmicos a partir de polifenoles se muestra en el diagrama 1, donde los microorganismos juegan un rol importante en la descomposición de los materiales orgánicos y en la formación o síntesis del humus (humificación).

**Diagrama 1. Formación de los ácidos húmicos**





Los conceptos de la formación del humus se pueden resumir en:

1. La lignina se libera de las uniones con la celulosa durante la descomposición de los residuos de plantas, oxidándose y formando unidades estructurales primarias (derivadas de fenilpropano).
2. Las cadenas de las unidades de lignina son oxidadas, la desmetilación ocurre, y los polifenoles son convertidos a quinonas por enzimas polifenoloxidasas.
3. Las quinonas reaccionan con compuestos que contienen nitrógeno para formar polímeros de color oscuro.

El rol de los microorganismos en la obtención de polifenoles ha sido enfatizado por Kononova, quien cuenta con investigaciones, en las cuales mediante el uso de técnicas microscópicas y métodos químicos estudió la descomposición de los residuos de las plantas. Los pasos en la formación de sustancias húmicas son:

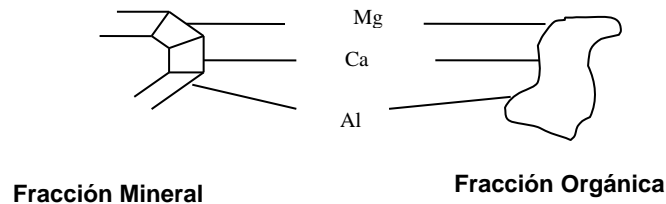
Paso 1. Los hongos atacan los carbohidratos simples y partes de la proteína y celulosa.

Paso 2. La celulosa del xilema es descompuesta por la aeróbica mixobacteria. Los polifenoles sintetizados por la mixobacteria son oxidados a quinonas por las enzimas polifenoloxidasas, y las quinonas secuencialmente reaccionan con compuestos de nitrógeno para formar sustancias húmicas oscuras.

Paso 3. La lignina es descompuesta. Los fenoles sirven como material en la síntesis del humus (4).

La materia orgánica está ligada a la fracción inorgánica del suelo, formando complejos muy estables, conocidos como humus (figura 1).

**Figura 1. Representación esquemática de la fracción organomineral**



### 3.2.3 Sustancias húmicas:

La mezcla de compuestos orgánicos de color negro, marrón, pardo o amarillo, que se extrae del suelo con soluciones alcalinas, sales neutras o disolventes orgánicos, lleva el nombre de sustancias húmicas. Las propiedades químicas de las sustancias húmicas son a menudo investigadas después del fraccionamiento de la materia orgánica, con base en características de solubilidad. La materia orgánica que ha sido solubilizada al tratar el suelo con una solución alcalina, generalmente NaOH, es separada de una parte orgánica insoluble llamada humina y es llevada a pH 1 con un ácido fuerte. El precipitado que se forma después de esta acidificación es llamado ácido húmico, y al decantado que queda soluble se llama ácido fúlvico (5).

Las sustancias húmicas consisten de una mezcla heterogénea de compuestos, donde cada fracción (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos) están constituidas de moléculas de tamaños diferentes. En contraste a los ácidos húmicos los ácidos fúlvicos de bajo peso molecular contienen gran cantidad de oxígeno y una considerable cantidad de grupos funcionales particularmente COOH. Otra importante diferencia es que prácticamente el oxígeno en los ácidos fúlvicos puede ser encontrado en grupos funcionales como COOH, OH, C=O; mientras una alta cantidad de el oxígeno en ácidos húmicos es encontrado como componente estructural de los núcleos (ejemplo en enlaces éter o éster). La acidez total de los ácidos fúlvicos (640-1420 meq/100g) es inconfundiblemente más alta que la de los ácidos húmicos (560-890meq/100g). Tanto el COOH y grupos ácidos OH (posiblemente OH fenólicos) contribuyen a la acidez natural de estas sustancias, donde el COOH es el más importante. La concentración de grupos funcionales

ácidos en los ácidos fúlvicos parecería sustancialmente más alta que en otros polímeros orgánicos encontrados naturalmente (4).

En los suelos y sedimentos este tipo de materiales se encuentran generalmente asociados con otro tipo de moléculas (sustancias no húmicas: carbohidratos, aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, resinas y minerales arcillosos). La asociación entre las sustancias mencionadas puede ocurrir mediante fenómenos meramente físicos (encapsulación) o interacciones de tipo químicos (formación de enlaces covalentes). En todos estos procesos, participan activamente los metales, principalmente metales de transición, presentándose una asociación diferencial Kerndorff, dependiendo del tipo de metal (6).

Las sustancias húmicas al igual que los compuestos orgánicos promueven la conversión de numerosos elementos hacia formas disponibles y asimilables para las plantas.

La fertilidad de un suelo orgánico se ha relacionado con su contenido en Humus, y esto se debe a las acciones que este material ejerce sobre los factores físicos, químicos y microbiológicos del suelo.

- Efectos Físicos

Las sustancias húmicas contribuyen a la estructura del suelo, por cuanto ellas aparecen usualmente en el humus como una sustancia semejante a un gel. Este gel se combina y recubre las partículas inorgánicas del suelo, para formar agregados muy estables y resistentes a la desintegración. Comúnmente el humus brinda “cuerpo” a los suelos livianos y ayuda a prevenir la compactación en los suelos arcillosos pesados.

Los ácidos húmicos, a través del humus, mejoran la capacidad de retención de agua de los suelos, como resultado de la floculación y agregación de las partículas, aumentando los espacios capilares. También como resultado de esta agregación, se incrementa la aireación del suelo. La erosión se reduce debido al mejoramiento de la estructura.

- Efectos Químicos

La función más importante de las sustancias húmicas en el suelo, es el aumento de la capacidad de intercambio catiónico (CIC). Si no ocurrieran reacciones de intercambio de bases o cationes en el suelo, la disponibilidad de nutrientes para las plantas se vería fuertemente reducida.

Los ácidos húmicos y fúlvicos ayudan de dos formas a una mayor disponibilidad de nitrógeno por parte de las plantas:

- a) Estimulan a los microorganismos del suelo, que contribuyen a la mineralización del humus, liberando nitrógeno en forma de amonio y nitratos asimilables por las plantas.
- b) Al formar parte del complejo arcillo-húmico, son capaces de retener los cationes amonio, evitando pérdidas por lixiviación.

- Efectos Biológicos

La actividad microbiana del suelo se ve estimulada y favorecida por los aportes de las sustancias húmicas, que le sirven de nutrientes y se multiplican más activamente cuando mejor provisto esté el suelo de humus. Además las sustancias húmicas estimulan la permeabilidad de la membrana celular, la formación de raíces y la germinación de semillas (7).

### 3.3 ÁCIDOS HÚMICOS

En el grupo de ácidos húmicos están englobados los compuestos que se extraen del suelo con soluciones de NaOH, KOH, NH<sub>4</sub>OH, NaHCO<sub>3</sub>, Na<sub>2</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, NaF, oxalato sódico, urea u otros, solos o en mezcla de ellos. Y que al acidificar lo extraído con ácidos minerales, HCl o H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, se precipitan de la solución obtenida en forma de un gel oscuro. Investigadores del siglo XIX como Sprengel, Berzelius, Mulder y otros, separaron los distintos compuestos que conforman este gel y resultó que su composición elemental y propiedades eran muy similares. Según las ideas de la Química Clásica en aquel tiempo, se consideraba que estas diferencias caracterizaban la naturaleza individual de los componentes del gel. Así

surgieron los nombres de ácidos húmicos, úlmico, músico, lumínico y otros. Con las posteriores investigaciones, se fue poniendo claro que los geles extraídos de los distintos suelos, turbas, restos vegetales en descomposición, a pesar de toda su diversidad, conservan principios de estructura química muy semejantes, pero esencialmente distinta a cualquier sustancia vegetal o animal que les dio origen.

Los ácidos húmicos son ácidos orgánicos polibásicos de débil disociación que tiene un punto equivalente en la titulación con una base en un rango de pH entre 8 y 9. Además de los grupos ácidos carboxílicos, fenólicos y alcohólicos, los ácidos húmicos tienen grupos metoxilos,  $-OCH_3$ , que van disminuyendo de 6-8% en ácidos húmicos “jóvenes” a valores de 1-2% en ácidos húmicos “maduros”.

Actualmente los ácidos húmicos son considerados unos polímeros, conformados por monómeros y estos a su vez formados por unidades estructurales. Estas unidades se componen de: a) un núcleo, b) una cadena puente, y c) grupos orgánicos reactivos (5).

Los ácidos húmicos son macromoléculas aromáticas complejas con amino-ácidos, amino-azúcares, péptidos y compuestos alifáticos que están involucrados en las uniones entre los grupos aromáticos. La estructura hipotética para los ácidos húmicos contiene grupos fenólicos libres y enlazados, estructuras de quinonas, nitrógeno y oxígeno como puentes y grupos de ácidos carboxílicos en varios lugares de los anillos aromáticos (8).

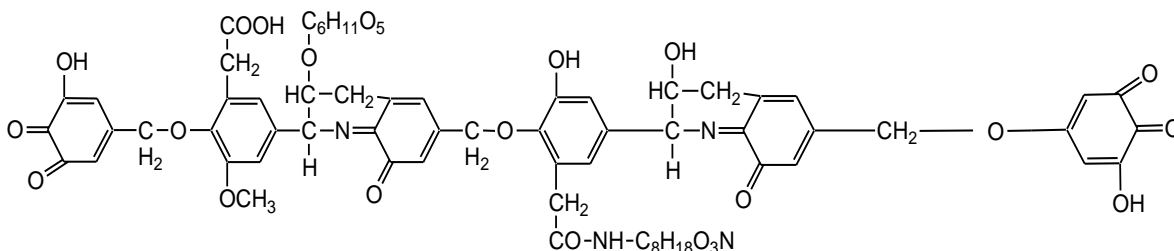
Sus principales características son: (9).

- Composición elemental aproximada: C (55.6%), H (4.5%), O (35.8%), N (4.2%).
- Pesos moleculares entre 50.000 y 100.000
- La estructura tipo consiste de micelas de naturaleza polimérica, con una estructura básica de anillos aromáticos de di o trihidroxifenol, con puentes de  $-O$ ,  $-CH_2-$ ,  $-NH-$ ,  $-N=$ ,  $-S-$  y con OH libres y dobles enlaces de quinonas.

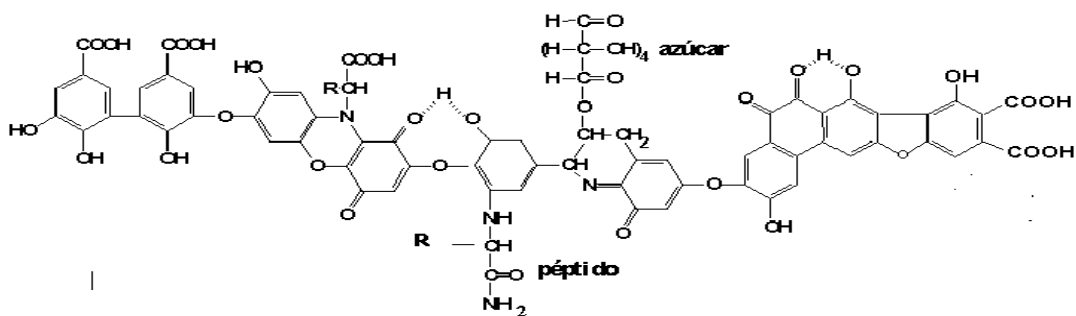
De acuerdo a los conceptos mencionados previamente para los ácidos húmicos se ha propuesto un tipo de estructura, la cual puede ser considerada enteramente satisfactoria. Las estructuras se muestran en la figura 2 y 3 donde se observa la

presencia de anillos aromáticos del tipo di y trihidroxibenzeno como la presencia de grupos quinona. Se sugiere que la estructura de Dragunov (figura 3.) no contiene el suficiente número de grupos carboxílicos (relativo a los OH fenólicos). Las dos estructuras muestran el nitrógeno como componente estructural e indican la presencia de residuos de carbohidratos y proteínas (4).

**Figura 2. Estructura hipotética de Dragunov de ácidos húmicos por Kononova**

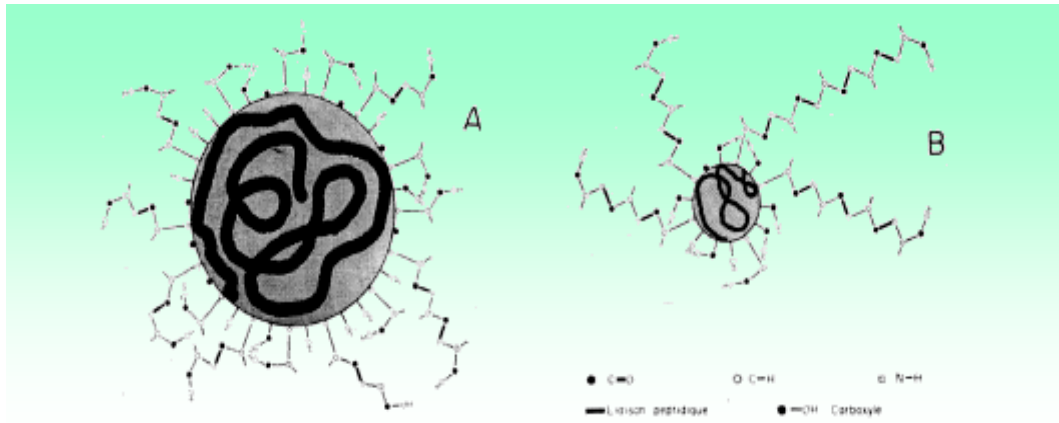


**Figura 3. Estructura hipotética de los ácidos húmicos por Stevenson**



Estas sustancias son clásicamente consideradas como polímeros amorfos de estructura aleatoria de entre 103 y 106 D de peso molecular, más o menos aromáticos, y con tenores variables en nitrógeno. Están formados por bloques elementales poliaromáticos ligados entre ellos por puentes ésteres, éter y carbono, y que llevan proporciones variables de grupos carboxílicos (-COOH), hidroxilos (-OH), amino (-NH<sub>2</sub> y -NH-), y otros grupos hidrofílicos. Un modelo esquemático ha sido propuesto hace varios años para ilustrar esta estructura (Figura 4) (10).

**Figura 4. Estructura esquemática de los ácidos húmicos (A) y fúlvicos (B) (según Andreux y Munier-Lamy, 1994)**



Autores como Burdon J. (2001) plantea que los compuestos con estructuras tradicionales para las sustancias húmicas (SH) no existen en suelos pero la materia orgánica del suelo consiste originalmente de mezclas de plantas y constituyentes microbiales más los mismos constituyentes en varios etapas de degradación. Esto es, las SH son mezclas de los carbohidratos de la planta más los carbohidratos microbiales, proteínas de las plantas más proteínas microbiales, lípidos de las plantas más lípidos microbiales, etc., junto con degradaciones parciales de lignina y taninos, y con materiales microbiales como las melaninas. Procesos puramente biológicos y reacciones abióticas, como la reacción de Maillard, son discutidas y rechazadas como el origen de las SH. Factores como el color de las SH, su espectro de resonancia de espín-electrón, fluorescencia, peso molecular, la presencia de ácido metílico y otros no requieren compuestos de el tradicional tipo presentes en las sustancias húmicas; ellas son enteramente explicables sobre la base de las mezclas plantas/microbios. La formación artificial es común en los estudios de las sustancias húmicas y puede ser seriamente engañosa (11).

Otros autores como MacCarthy (2001) plantea el concepto de seudo estructuras, las cuales no son estructuras moleculares, no son estructuras promedio o un modelo promedio estructural. Las seudo estructuras son definidas como constituciones moleculares hipotéticas con elementos, estructuras y grupos funcionales parecidos y consistentes con algo o todas las propiedades observadas de una mezcla. No obstante las seudo estructuras individuales pueden apartarse considerablemente de las medidas de composición elemental, contenido de grupos funcionales y peso molecular de las sustancias húmicas. Una mayor

diferenciación entre las estructuras moleculares y las pseudo estructuras se encuentra consignada en la tabla N° 1 (12).

**Tabla 1. Comparación de pseudo estructuras con estructuras moleculares**

<b>Estructura Molecular</b>	<b>Pseudo estructura</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es real, y corresponde a la sustancia aislada</li> <li>• Describe una sustancia singular</li> <li>• Representa todas las moléculas de un compuesto dado</li> <li>• Es independiente de cómo la sustancia es producida</li> <li>• Corresponde a una fórmula molecular particular</li> <li>• Una estructura molecular singular es única para un compuesto particular</li> <li>• Describe una molécula completa</li> <li>• Provee toda la conectividad al interior de la molécula</li> <li>• Puede permitir calcular la distancia entre un par de átomos</li> <li>• Posee un peso molecular específico</li> <li>• Permite cuantificar la composición elemental</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Una construcción hipotética que no corresponde a la sustancia aislada</li> <li>• Describe propiedades de una mezcla compleja</li> <li>• Es posible que una pseudo estructura no es idéntica a alguna molécula en un sistema</li> <li>• Puede ser influenciada por la suposición de moléculas precursoras y vías de formación.</li> <li>• No se restringe a una fórmula molecular específica</li> <li>• Muchas pseudo estructuras diferentes pueden ser propuestas para representar el mismo sistema</li> <li>• Puede intentar representar todo o solo fracciones selectas de un sistema</li> <li>• Provee poca información definitiva sobre la extensa conectividad</li> <li>• No puede ser usada para calcular la distancia interatómica</li> <li>• No tiene un peso molecular específico (incluye un peso aproximado)</li> <li>• No tiene una conformación rigurosa para la cuantificación elemental</li> </ul>



<ul style="list-style-type: none"> <li>• Incluye todos los elementos del análisis elemental</li> <li>• Incluye todas las estructuras características*</li> <li>• Provee detalle de la información estereoquímica</li> <li>• Provee las bases para una conformación molecular anticipada</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No incluye algunos elementos menores</li> <li>• Las pseudo estructuras no incluyen todas las estructuras características*</li> <li>• No provee una rigurosa información estereoquímica</li> <li>• No se puede usar como base para calcular detalladamente la conformación molecular</li> </ul>
--	---

\* Las estructuras características incluyen grupos funcionales, uniones, componentes estructurales como grupos aromáticos y alifáticos, y electrones desapareados.

Estas son las razones por las cuales es muy importante y necesario realizar una caracterización estructural de estas sustancias en nuestros suelos colombianos, que nos permita tener bases teóricas significativas para el mantenimiento y mejoramiento de los suelos y los cultivos que en ellos se produce. La poca investigación en Colombia sobre la estructura y la composición de los ácidos húmicos en el departamento del Cauca y los aportes que hay hoy a nivel mundial junto con el desarrollo de varias técnicas analíticas, permitirán el estudio estructural de dichas sustancias en suelos Colombianos y de este modo realizar aportes al desarrollo científico de nuestro país en el campo de la Química de los suelos.

### 3.4 EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS

Teniendo en cuenta las diferentes definiciones, posibles estructuras y efectos tanto físicos como químicos y biológicos de las sustancias húmicas, es necesario entrar a desarrollar su extracción y separación en ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas, para su posterior caracterización.

Existen diversos métodos para la extracción y separación de las sustancias húmicas dentro de los cuales se encuentran los métodos granulométricos y densimétricos, que pretenden un fraccionamiento de la materia orgánica en M.O.H (materia orgánica humificada) donde están contenidas las sustancias húmicas, y la M.O.F (materia orgánica fresca) que contiene el resto de compuestos orgánicos provenientes de residuos de animales y plantas. Las sustancias húmicas presentes en la M.O.H se extraen secuencialmente mediante el uso de soluciones básicas que tienen como objeto separar la fracción Fúlvica y los ácidos húmicos

de las huminas, debido a que estas últimas son insolubles tanto a pH ácido como básico.

La diferencia que existe entre los métodos de extracción y separación de las sustancias húmicas radica en la utilización de distintas soluciones como por ejemplo el método sugerido por el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca, el cual emplea soluciones de tetraborato, pirofosfato e hidróxido de sodio para la extracción de las sustancias húmicas y soluciones ácidas junto a la centrifugación y liofilización para la separación de los ácidos fúlvicos (solubles a cualquier pH) de los ácidos húmicos (solubles a pH básico). Mientras que Almendros et al (1998) utilizan soluciones de hidróxido y pirofosfato de sodio y agua con metilisobutilcetona (MIBK) (13).

Los ácidos húmicos obtenidos mediante separación ácida sobre los sobrenadantes de la extracción secuencial, se purifican con el empleo de centrifugación de alta velocidad, soluciones ácidas de HCl-HF al 1% y diálisis mediante membranas de 12000 daltons, para separar la fracción inorgánica unida a estas sustancias y disminuir los cloruros y los iones hidróxido presentes en la solución de los ácidos húmicos.

Respecto a la caracterización de las sustancias húmicas existen diversas técnicas químicas y espectroscópicas como por ejemplo: análisis elemental, pirólisis acoplada con espectroscopía de masas, métodos degradativos, espectroscopía infrarroja, UV – visible, RMN, etc. De las cuales la espectroscopia de resonancia magnética nuclear es una de las más empleadas (14).

### **3.4.1 Relación E4/E6**

La relación de las densidades ópticas o absorbancias de las soluciones acuosas de ácidos húmicos y fúlvicos a 465 y 665 nm es ampliamente utilizada por los científicos del suelo en la caracterización de esos materiales.

La relación usualmente denominada E4/E6 es independiente de la concentración de los materiales húmicos y sus valores varían según los diferentes tipos de suelo. Además es una de las determinaciones más simples desde el punto de vista analítico, el material húmico se disuelve con una solución 0.05N de la sal básica  $\text{NaHCO}_3$ . A la solución resultante se le mide el grado de absorción a dos longitudes de onda: 465 y 665 nm. El respectivo índice permite diferenciar los ácidos húmicos de los fúlvicos; se considera que valores superiores a 5, son propios de los ácidos fúlvicos (15, 17).

Se ha considerado, que mientras más compleja estructuralmente es la molécula de la sustancia húmica; es decir, un mayor contenido de carbono haciendo parte de estructuras altamente conjugadas menor es el valor de la relación. Estos hechos han sido confirmados utilizando espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  RMN (16, 17).

### 3.4.2 Espectroscopía infrarroja

Una molécula vibra constantemente: sus enlaces se alargan y se contraen (vibraciones de estiramiento o de valencia) o sufren flexión unos con respecto al átomo central. La absorción de la radiación infrarroja produce modificaciones en estas vibraciones.

Mientras que la absorción de radiaciones electromagnéticas en la región visible y del ultravioleta se traduce en cambios en las energías electrónica, vibracional, y rotacional de las moléculas, la energía (más pequeña) de la radiación I.R., afecta solamente los niveles vibracionales y rotacional de la molécula irradiada. Sin embargo podemos aceptar, para la mayoría de nuestros propósitos, que la región entre 2.5 micras ( $4000\text{cm}^{-1}$ ) y 16 micras ( $625\text{cm}^{-1}$ ), en el cual se registran la mayoría de los espectrofotómetros comerciales, afecta únicamente los niveles vibracionales de la molécula.

Mediante el estudio de una gran cantidad de compuestos orgánicos y siguiendo distintos métodos de comprobación, ha sido posible asignar a los principales grupos funcionales, bandas de absorción características y establecer cómo, la posición y aún la forma de estas bandas pueden variar de acuerdo con las condiciones estructurales y electrónicas, y también por cambios en el estado físico o en el solvente. Desde el punto de vista de un químico, se tiene que las diferencias estructurales y funcionales que intervienen en la reactividad de las moléculas, conduce a las diferencias en las características espectrales, en todas las regiones del espectro electromagnético.

Postulados fundamentales sobre la utilidad de la espectroscopía infrarroja son los siguientes:

- Las sustancias orgánicas presentan frecuencias de grupo, características en la región IR.

- El espectro de absorción de una sustancia dada, es específico para dicha sustancia. En otras palabras, es posible que dos o más sustancias que tengan los mismos grupos funcionales, presenten espectros muy parecidos, pero en su conjunto deben existir varias diferencias que permiten individualizar cada espectro.
- El espectro de absorción de mezclas de sustancias, es generalmente aditivo; es decir corresponde a la suma de los espectros individuales de los componentes.
- La intensidad de una banda de absorción está relacionada con la concentración de la sustancia que absorbe la radiación incidente (18).

Los ácidos húmicos extraídos de diferentes orígenes, como suelos, agua, compost y ácido húmico comercial presentan bandas características en los espectros infrarrojos como: 3500-3000  $\text{cm}^{-1}$  enlaces de H, grupos OH y N-H; 3000-2800  $\text{cm}^{-1}$  grupos alifáticos C-H; 1725-1600  $\text{cm}^{-1}$  grupo C=O; 1620-1600  $\text{cm}^{-1}$  C=C; 1460-1450  $\text{cm}^{-1}$  C-H de grupos alifáticos; 1400-1390  $\text{cm}^{-1}$  grupos O-H, COO y C-O; 1320-1200  $\text{cm}^{-1}$  C-O y O-H de COOH; 1180-1000  $\text{cm}^{-1}$  C-O de alcohol, éter, éster, polisacáridos y O-H de alcohol (19).

### 3.4.3 Espectroscopía de resonancia magnética nuclear

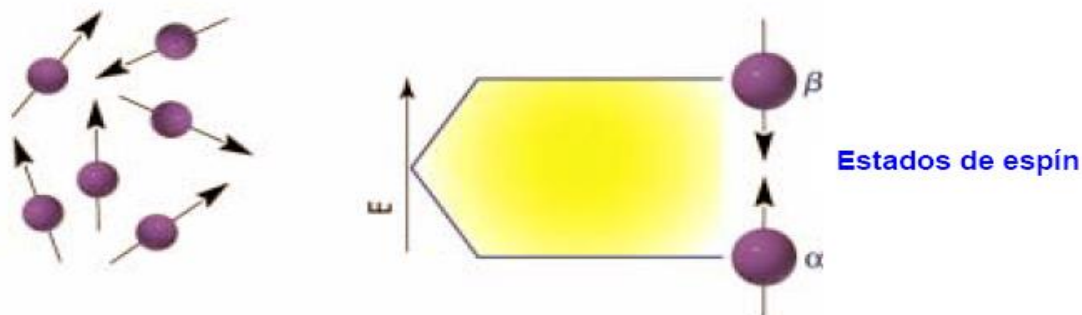
La espectroscopía de RMN fue desarrollada a finales de los años cuarenta para estudiar los núcleos atómicos. En 1951, los químicos descubrieron que la espectroscopía de resonancia magnética nuclear podía ser utilizada para determinar las estructuras de los compuestos orgánicos. Esta técnica espectroscópica puede utilizarse sólo para estudiar núcleos atómicos con un número impar de protones o neutrones (o de ambos). Esta situación se da en los átomos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{19}\text{F}$  y  $^{31}\text{P}$ . Este tipo de núcleos son magnéticamente activos, es decir poseen espín, igual que los electrones, ya que los núcleos poseen carga positiva y poseen un movimiento de rotación sobre un eje que hace que se comporten como si fueran pequeños imanes.

En ausencia de campo magnético, los espines nucleares se orientan al azar. Sin embargo cuando una muestra se coloca en un campo magnético, tal y como se muestra en la figura 5, los núcleos con espín positivo se orientan en la misma dirección del campo, en un estado de mínima energía denominado estado de espín  $\alpha$ , mientras que los núcleos con espín negativo se orientan en dirección

opuesta a la del campo magnético, en un estado de mayor energía denominado estado de espín  $\beta$ .

Existen más núcleos en el estado de espín  $\alpha$  que en el  $\beta$  pero aunque la diferencia de población no es enorme sí que es suficiente para establecer las bases de la espectroscopía de RMN.

**Figura 5. Estados de espín de los núcleos atómicos**



La diferencia de energía entre los dos estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ , depende de la fuerza del campo magnético aplicado  $H_0$ . Cuanto mayor sea la intensidad del campo magnético, mayor diferencia energética habrá entre los dos estados de espín.

Cuando una muestra que contiene un compuesto orgánico es irradiada brevemente por un pulso intenso de radiación, los núcleos en el estado de espín  $\alpha$  son promovidos al estado de espín  $\beta$ . Esta radiación se encuentra en la región de las radiofrecuencias (**rf**) del espectro electromagnético por eso se le denomina radiación rf. Cuando los núcleos vuelven a su estado inicial emiten señales cuya frecuencia depende de la diferencia de energía ( $\Delta E$ ) entre los estados de espín  $\alpha$  y  $\beta$ . El espectrómetro de RMN detecta estas señales y las registra como una gráfica de frecuencias frente a intensidad, que es el llamado espectro de RMN. El término resonancia magnética nuclear procede del hecho de que los núcleos están en resonancia con la radiofrecuencia o la radiación rf. Es decir, los núcleos pasan de un estado de espín a otro como respuesta a la radiación rf a la que son sometidos.

### 3.4.2.1 Espectroscopía $^{13}\text{C}$ RMN

La resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es complementaria a la de  $^1\text{H}$ . Esta última técnica se utiliza para deducir la estructura del esqueleto carbonado observando los entornos magnéticos de los átomos de hidrógeno, mientras que la espectroscopia de RMN de  $^{13}\text{C}$  determina el entorno magnético de los átomos de carbono. Aproximadamente el 99% de los átomos de carbono en una muestra natural son del isótopo  $^{12}\text{C}$ . Este isótopo posee un número par de protones y un número par de neutrones, por tanto, no tiene espín magnético y no puede dar lugar a señales de resonancia magnética nuclear. El isótopo de  $^{13}\text{C}$  menos abundante tiene un número impar de neutrones, lo que le confiere un espín magnético de  $1/2$ , igual al del protón.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  es menos sensible que la de  $^1\text{H}$  debido a que sólo el 1% de los átomos de carbono posee espín y a que, además, la frecuencia de resonancia del  $^{13}\text{C}$ , para un campo magnético dado, es la cuarta parte de la que se da en la RMN de  $^1\text{H}$ .


Los desplazamientos químicos del carbono son de 15 a 20 veces mayores que los del hidrógeno debido a que el carbono está directamente unido a los átomos que resultan ser bien apantallantes o desapantallantes. Por ejemplo, el protón de un aldehído absorbe a 9.4 ppm en el espectro de  $^1\text{H}$  mientras que el carbono de carbonilo absorbe a 180 ppm en el espectro de  $^{13}\text{C}$ . Además, las señales en el espectro de  $^{13}\text{C}$  son líneas verticales, es decir, no hay desdoblamientos de espín-espín. Esto se debe a que sólo el 1% de los átomos de carbono entran en resonancia, y por tanto, existe una probabilidad muy pequeña de que un núcleo de  $^{13}\text{C}$  esté adyacente a otro núcleo de  $^{13}\text{C}$ .

A continuación en la tabla 2 se dan unos valores aproximados de desplazamientos químicos en un espectro de resonancia magnética nuclear de  $^{13}\text{C}$  (20).

**Tabla 2. Desplazamientos químicos**

Estructura	$(\text{CH}_3)_4\text{Si}$	$\text{R}-\text{CH}_3$	$\text{R}-\text{CH}_2-\text{R}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{R}-\text{C}-\text{H} \\   \\ \text{R} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{R} \\   \\ \text{R}-\text{C}-\text{R} \\   \\ \text{R} \end{array}$	$-\text{C}\equiv\text{C}-$	$\begin{array}{c} \diagup \\ \text{C}=\text{C} \\ \diagdown \end{array}$
J (Hz)	0	8-35	15-20	20-60	30-40	65-85	100-150

Estructura		$\text{I}-\text{C}-\text{Br}$	$\text{Cl}-\text{C}$	$\text{N}-\text{C}$	$\text{O}-\text{C}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{OR} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{OH} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{O} \\    \\ \text{C}-\text{H} \end{array}$	
J (Hz)	110-170	0-40	25-65	35-80	40-60	50-80	165-185	175-185	190-200

De acuerdo a las investigaciones realizadas por Kang et al (2003) las bandas que presentan los ácidos húmicos en un espectro RMN  $^{13}\text{C}$  se encuentra que son identificadas e integradas: 0 – 50 ppm principalmente carbonos alifáticos o parafínicos, 50 – 60 ppm grupos metoxi, 60 – 96 ppm grupos  $-\text{CH}_2\text{O}$ , 96 – 108 ppm grupos anoméricos, 108 – 145 ppm grupos aromáticos, 145 – 162 ppm grupos fenólicos, 162 – 190 ppm grupos carboxílicos y 190 – 220 ppm grupos carbonílicos (21).

Esta técnica junto a la espectroscopía infrarroja aportan informaciones complementarias.

## **4. METODOLOGÍA**

### **4.1. UBICACIÓN GEOGRÁFICA**

El suelo seleccionado para el desarrollo del proyecto corresponde a un Andisol del departamento del Cauca, ubicado en la vereda La Aurelia del municipio de Cajibío; a 1740 metros sobre el nivel del mar y con una precipitación pluvial de 1500mm a 19 grados centígrados. El terreno donde se tomaron las muestras presentaba cultivos de Café Caturro y Caña de Azúcar.

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Agroquímica; el proceso de centrifugación se llevó a cabo en el laboratorio de Genética Humana; el proceso de liofilización se hizo en el laboratorio en Biología Celular y Molecular, los análisis de espectroscopía Infrarroja se efectuaron en el laboratorio de Organometálica, de la Universidad del Cauca. Los análisis de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  se hicieron en el Departamento de Química de la Universidad de Oslo.

La zona de vida, de acuerdo a Holdridge, corresponde a un bosque húmedo premontano, Bh – Pm (22).

### **4.2. TOMA DE MUESTRA**

Para obtener un valor analítico representativo del volumen del suelo se dividió el terreno seleccionado en unidades de muestreo y se seleccionó una de ellas alrededor de los cultivos, teniendo presente que dicha unidad no estuviera abonada. Una vez seleccionada la unidad de muestreo se tomaron ocho muestras de suelo, al azar pero formando un recorrido en zig-zag, a una profundidad de 30 cm y eliminando los bordes y la vegetación superficial. Con la profundidad seleccionada se pretendió abarcar la totalidad del horizonte A, donde se encuentra la capa arable y el mayor contenido de materia orgánica.

Posteriormente se procedió a formar la muestra compuesta, representativa de la unidad de muestreo, mezclando y homogenizando en un balde de plástico las ocho muestras de suelo y de este modo trasladarla al laboratorio de Agroquímica para secarla y tamizarla a través de un tamiz malla 2mm, para finalmente



empacarla, rotularla y determinarle sus propiedades físicas y químicas y extraer las sustancias húmicas presentes en ella (23).

### **4.3. CARACTERIZACIÓN DE PARÁMETROS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL SUELO**

Con el objeto de identificar el suelo a estudiar se evaluaron una serie de parámetros físicos y químicos mediante metodología estandarizada en el Laboratorio de Agroquímica de acuerdo a Bravo et al (2003). Donde todos estos parámetros se realizaron por duplicado utilizando como resultado final el promedio de dichas mediciones (23).

#### **4.3.1. Parámetros físicos**

##### **4.3.1.1. Humedad**

Se determinó mediante el método gravimétrico, con la diferencia de pesos de una cantidad determinada de una muestra de suelo seco a temperatura ambiente y posteriormente a 105 grados centígrados, pesando dos muestras del mismo suelo, en cápsulas taradas previamente, las cuales se llevaron a la estufa por 24 horas a 105 °C (23).

##### **4.3.1.2. Densidad real**

El método del picnómetro es el más empleado para medir la densidad de los sólidos o gravedad específica. Consiste en determinar la masa y el volumen de los sólidos del suelo a través de un recipiente de volumen conocido. Se pesó el picnómetro completamente seco luego se agregó 2 g de suelo seco a 105 °C, se adicionó 1/3 de agua destilada y se aplicó vacío por dos horas, para eliminar las burbujas de aire, luego se agregó agua hasta completar 2/3 del volumen del picnómetro y de nuevo se aplicó vacío por una hora; finalmente se llenó con agua, se tapó y se pesó. Se vació el contenido, se lavó y se llenó con agua destilada, se tapó y pesó, donde la diferencia de los distintos pesos proporciona el valor de la densidad real (24).

#### **4.3.1.3. Textura**

Consiste en determinar la cantidad de sólidos en suspensión por medio del hidrómetro. La profundidad del centro de flotación del hidrómetro varía con la densidad de la suspensión y también con la textura. Bouyoucos (1962), basado en la ley de Stokes, en la cual la velocidad de caída de las partículas de diferente tamaño en un medio líquido es directamente proporcional al cuadrado del radio de la partícula, determinó que después de 40 segundos todas las partículas mayores de 50 micras se sedimentan, de tal manera que no tendrán ninguna influencia sobre el hidrómetro. Las lecturas realizadas una hora después, corresponden a partículas mayores de 5 micras y a las dos horas a las partículas menores de 2 micras. Por lo tanto el método de Bouyoucos consiste en medir la densidad del suelo en agua, con un hidrómetro a diferentes tiempos: la primera lectura se tomó a los 40 segundos de preparada la suspensión, tiempo en el cual se han sedimentado las arenas, midiéndose así la densidad de limos más arcillas. Luego se tomó otra lectura a las dos horas tiempo en el cual han sedimentado los limos quedando en suspensión las arcillas (23).

#### **4.3.2. Parámetros químicos**

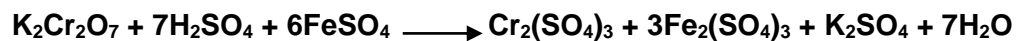
##### **4.3.2.1. pH**

El pH se determinó por medio del uso de un potenciómetro que permite cuantificar la actividad de los iones  $H^+$  en el suelo. Para realizar el análisis se tomaron dos muestras de suelo en suspensión de agua destilada, utilizando una relación de 1:2.5 (suelo-agua). Se agitó intermitentemente durante una hora y luego se midió el pH (23).

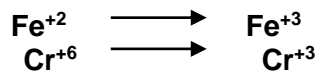
##### **4.3.2.2. Determinación de la materia orgánica**

El contenido de materia orgánica en el suelo se determinó mediante el método Walckley – Black. El cual consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo con un oxidante en medio ácido; el oxidante empleado es  $K_2Cr_2O_7$  y el ácido es  $H_2SO_4$  concentrado. Por medio de este método se extrae el carbono fácilmente oxidable (23).

Se pesaron dos muestras del suelo, a las cuales se les agregó 10mL de dicromato de potasio 0.1N y 20mL de ácido sulfúrico. Se agitó y se dejó enfriar. Una vez frío se le adicionó 150mL de agua destilada, 10mL de ácido fosfórico y 3 gotas de ferroína, valorando el exceso de dicromato de potasio con una solución de sulfato de hierro pentahidratado, llevándose un blanco de muestra. Las reacciones ocurridas en la determinación son:

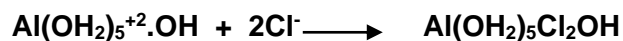


Correspondiendo la última reacción a las siguientes semirreacciones:



#### 4.3.2.3. Acidez y aluminio intercambiable

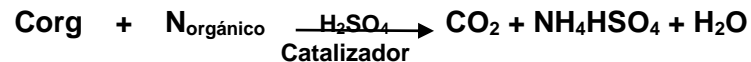
Para su determinación se utilizó el método de desplazamiento de los cationes del suelo con una solución neutra de KCl, liberando así los iones  $\text{H}^+$  y  $\text{Al}^{+3}$ , los cuales son titulables con NaOH en presencia de fenolftaleína. Una vez titulados estos iones, quedando en forma de  $\text{Al}(\text{OH}_2)_5^{+2}$  se valora el  $\text{Al}^{+3}$  presente. Se tomaron dos muestras en frascos de extracción de 50 mL, se les agregó 50 mL de KCl 1N y se agitó durante cinco minutos. Se filtró y el filtrado se tituló con una solución de NaOH 0.1N. A la solución procedente de la anterior titulación se le agregó una gota de HCl 0.05N para decolorarla y luego 10 mL NaF 4% y se tituló con HCl 0.2N. Las reacciones correspondientes son: (23):



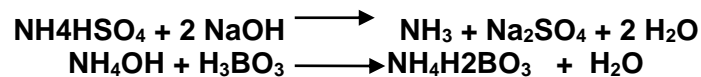
#### 4.3.2.4. Determinación de nitrógeno por el método de Kjeldahl

Para su determinación, la muestra de suelo se trató separadamente con ácido sulfúrico concentrado y catalizadores para oxidar la materia orgánica y convertir el nitrógeno en sulfato ácido de amonio. El sulfato de amonio se descompuso por medio de un exceso de álcali para liberar el amoniaco el cual se recoge por destilación sobre ácido bórico. El borato de amonio formado en el paso anterior se valoró con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  0.20N utilizando como indicadores una mezcla de rojo de metilo y azul de metileno o de rojo de metilo y verde de bromocresol. Las reacciones que ocurren en el proceso son (23):

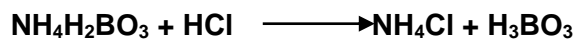
- Oxidación de la muestra:



- Descomposición del sulfato ácido de amonio:

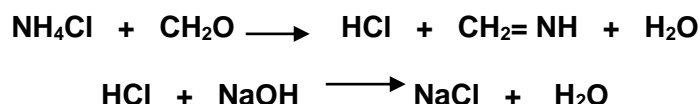


- Titulación del borato de amonio:



#### 4.3.2.5. Determinación de la capacidad de intercambio catiónico y bases de cambio.

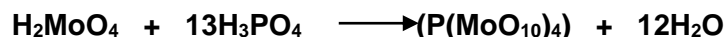
El método consistió en sacar todos los cationes que tiene el suelo, reemplazándolos por  $\text{NH}_4^+$ . El suelo seco, tamizado y muy fino se saturara con acetato de amonio 1N pH 7, se trató de llevar la saturación al máximo, pero que sea estable. El ión amonio se desplazó con  $\text{Na}^+$  ( $\text{NaCl}$  al 10%), por lo que el  $\text{NH}_4^+$  queda en forma de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , se agregó formol neutralizado al 40% y el  $\text{HCl}$  generado se tituló con  $\text{NaOH}$  0.1N en presencia de fenolftaleína. Las reacciones que suceden son:



Los cationes desplazados (Ca, Mg, Na, K) se determinaron mediante la técnica de espectrofotometría de absorción atómica (23).

#### 4.3.2.6. Determinación de fósforo

Se determinó por el método Bray II, adecuado para suelos ácidos, con una solución extractora de fluoruro de amonio en medio ácido, en donde el ión fluoruro precipita el calcio soluble por lo que extrae las formas P-Ca más solubles,  $\text{CaHPO}_4$ , que son las formas disponibles en medio ácido. Una vez extraído el fósforo se procedió a su determinación por el método espectrofotométrico, el cual consiste en formar un complejo del fósforo con ácido molibdico, reduciéndolo con ácido ascórbico, para formar un complejo coloreado que absorbe a 660nm. La lectura se realizó en el espectrofotómetro, Spectronic 21, a 660nm. De acuerdo a la siguiente reacción (23):



### 4.4. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE SUSTANCIAS HÚMICAS

#### 4.4.1. Fraccionamiento de la muestra

Con el objetivo de obtener los ácidos húmicos para su posterior caracterización, como primer paso, se obtuvieron las sustancias húmicas de la materia orgánica. Para lo cual se efectuó inicialmente un fraccionamiento de la materia orgánica en: materia orgánica humificada, (M.O.H) y materia orgánica fresca, (M.O.F), empleando el método granulométrico y separando la materia orgánica libre, (M.O.L) de la M.O.H obtenida, usando el método densimétrico.

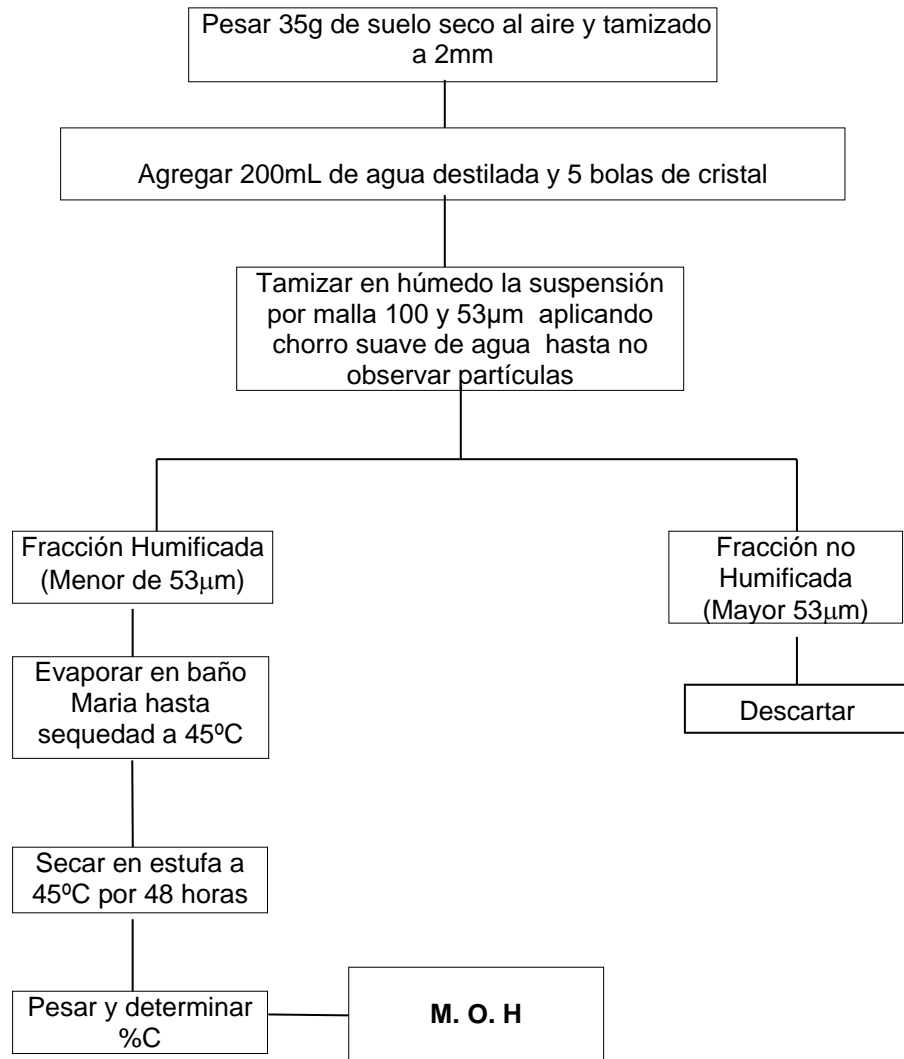
El método granulométrico implementado por los trabajos anteriormente realizados en el Laboratorio de Agroquímica (25), consistió en disociar por tratamiento

mecánico, a través de un tamizador eléctrico, los agregados normalmente estables del suelo en el agua. Teniendo en cuenta que este tratamiento produce el mínimo de desnaturalización

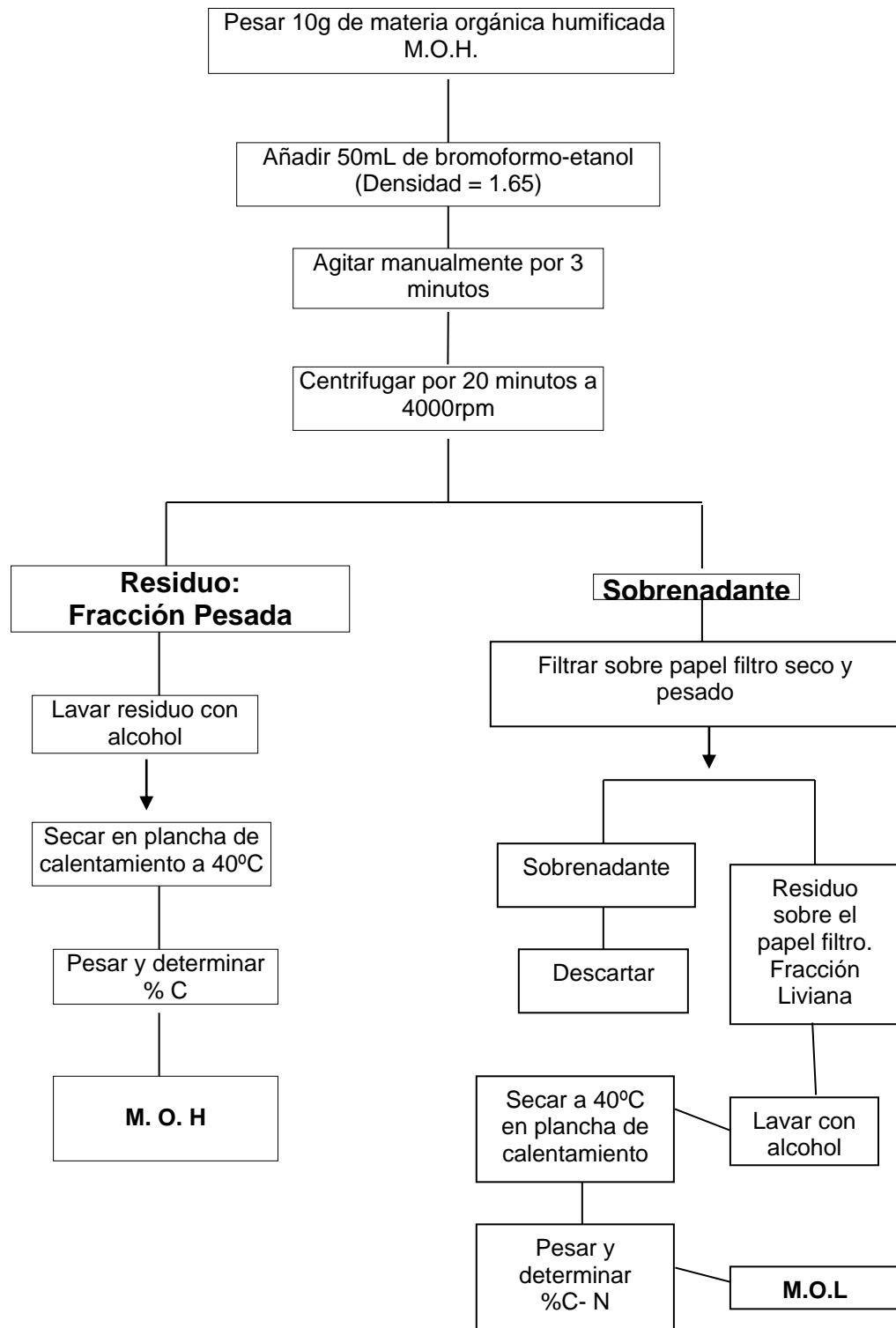
Mientras que con el método densimétrico se utilizó una solución orgánica de bromoformo-etanol, a través de la cual se libera los materiales orgánicos poco transformados de los ya transformados o ligados, mediante la centrifugación.

En los diagramas 2 y 3 se puede observar detalladamente los procedimientos para las dos metodologías aplicadas.

**Diagrama 2. Método granulométrico para el fraccionamiento de la materia orgánica**



**Diagrama 3. Método densimétrico para el fraccionamiento de la M.O.H.**

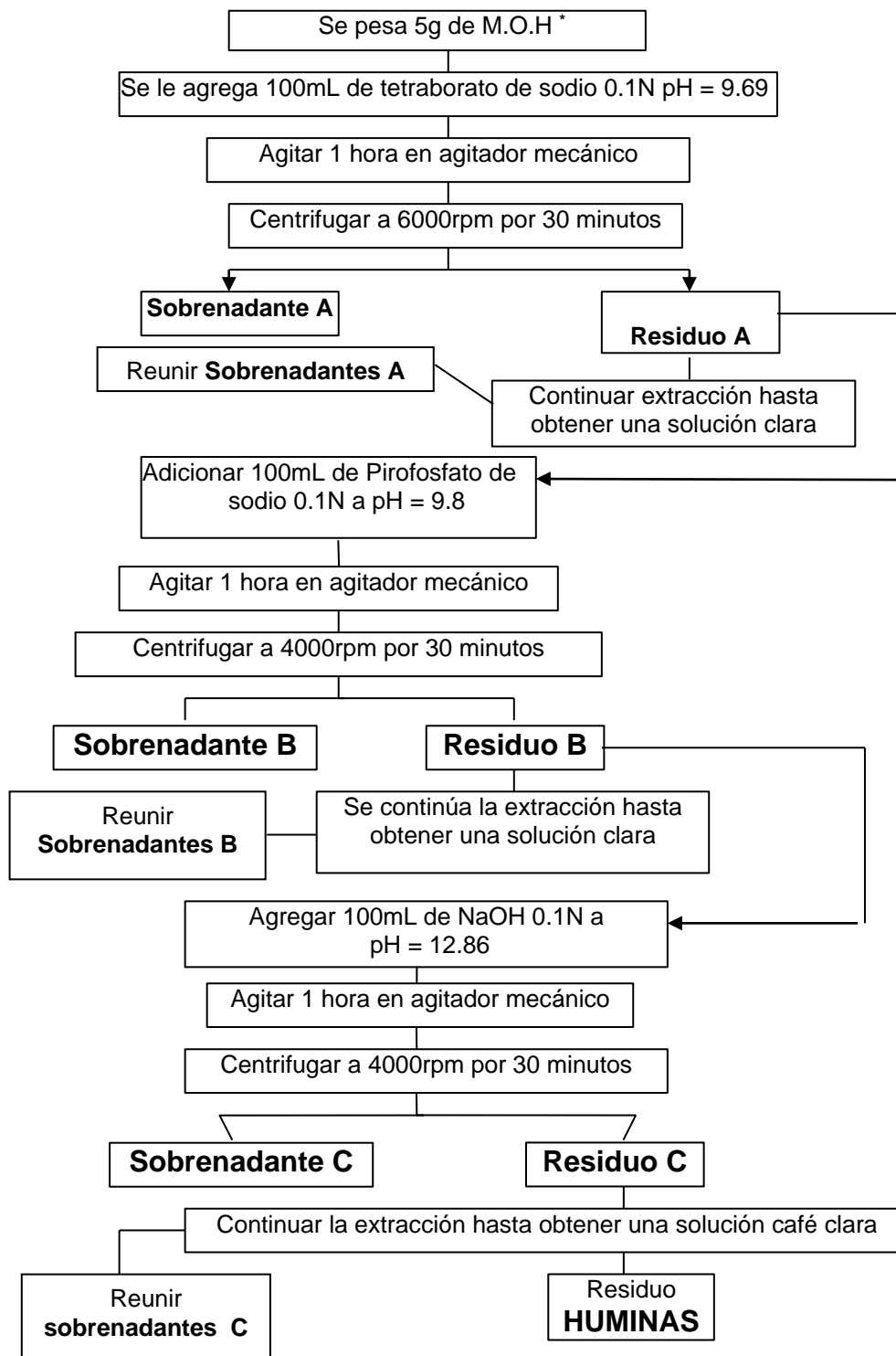




#### **4.4.2. Extracción y separación de las sustancias húmicas**

En la extracción de las sustancias húmicas se partió de la materia orgánica humificada (M.O.H) empleando el método sugerido por Dávila Janeth (2002) (25), con algunas modificaciones, como en las velocidades de centrifugación y la adición de filtración al vacío. Se realizó una extracción sucesiva mediante el uso de tres soluciones diferentes de carácter básico con el objeto de separar la fracción fúlvica y los ácidos húmicos, de las huminas, debido a que estas últimas son insolubles a cualquier pH. Las soluciones empleadas son: a) una solución de tetraborato de sodio 0.1N, para romper enlaces electroestáticos por simple intercambio iónico, b) una solución de pirofosfato de sodio 0.1N, para romper enlaces de coordinación, específicamente uniones entre la materia orgánica y las arcillas con lo que se afectan los complejos inmóviles y c) una solución de hidróxido de sodio 0.1N, la cual destruye casi todos los enlaces organominerales. De esta forma se obtuvieron varios sobrenadantes, donde se encuentran los ácidos fúlvicos y húmicos y una fracción insoluble que se denomina humina. En el diagrama N° 4 se recopila la metodología utilizada para dicha extracción.

**Diagrama 4. Extracción de las sustancias húmicas**

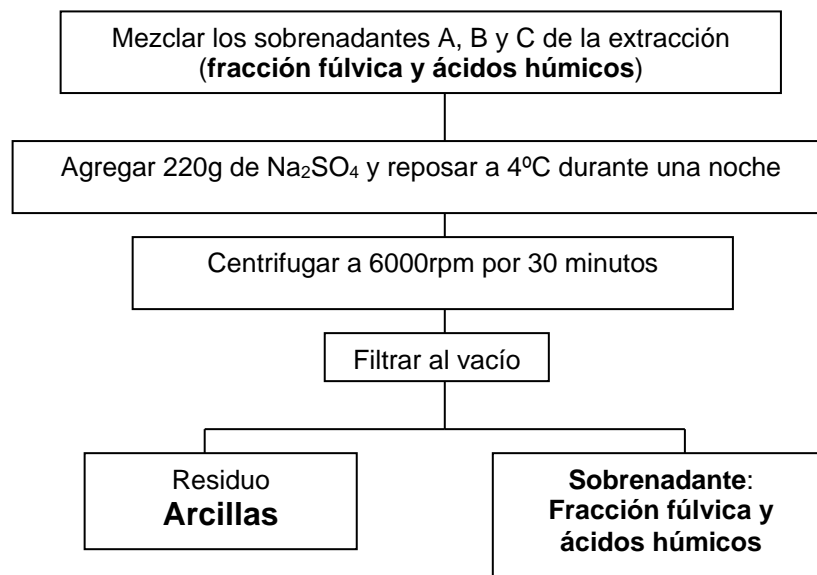


\* La extracción se efectuó a 20a de M.O.H

#### 4.4.2.1 Floculación de arcillas:

Las sustancias húmicas se encuentran en la naturaleza ligadas a compuestos inorgánicos, como las arcillas, formando un agregado muy estable organomineral conocido como humus. Las arcillas se separaron de las sustancias húmicas mediante una floculación con sulfato de sodio, según el diagrama N° 5.

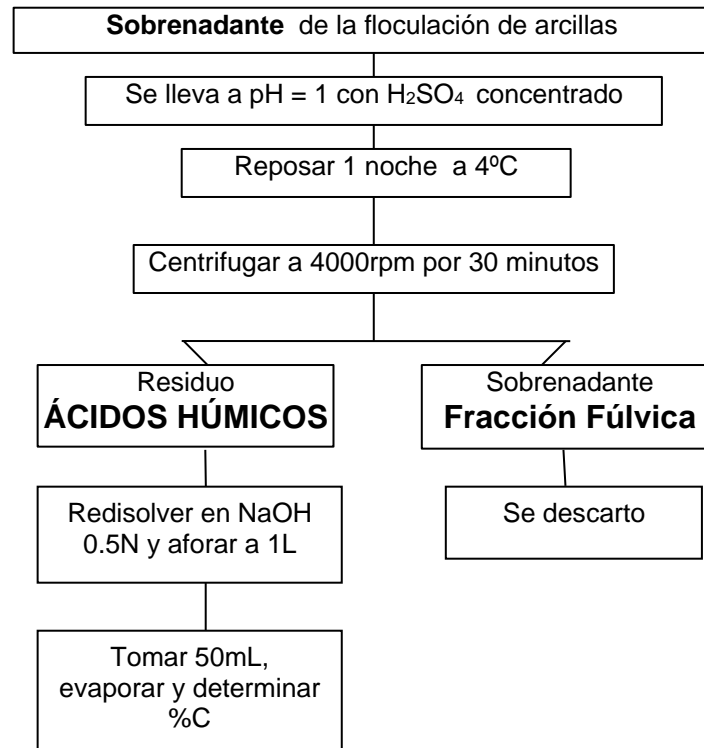
**Diagrama 5. Floculación de las arcillas**



#### 4.4.2.2. Separación de ácidos húmicos de la fracción fúlvica

La separación de los ácidos húmicos de los ácidos fúlvicos, se realizó a partir de los sobrenadantes obtenidos de la extracción sucesiva, anteriormente mencionada, empleando ácido sulfúrico para precipitar los ácidos húmicos, ya que son insolubles a pH ácidos. Obteniéndose de este modo un sobrenadante correspondiente a la fracción fúlvica y un residuo correspondiente a los ácidos húmicos. La metodología empleada se encuentra en el diagrama N° 6.

**Diagrama 6. Separación de los ácidos húmicos y fúlvicos.**

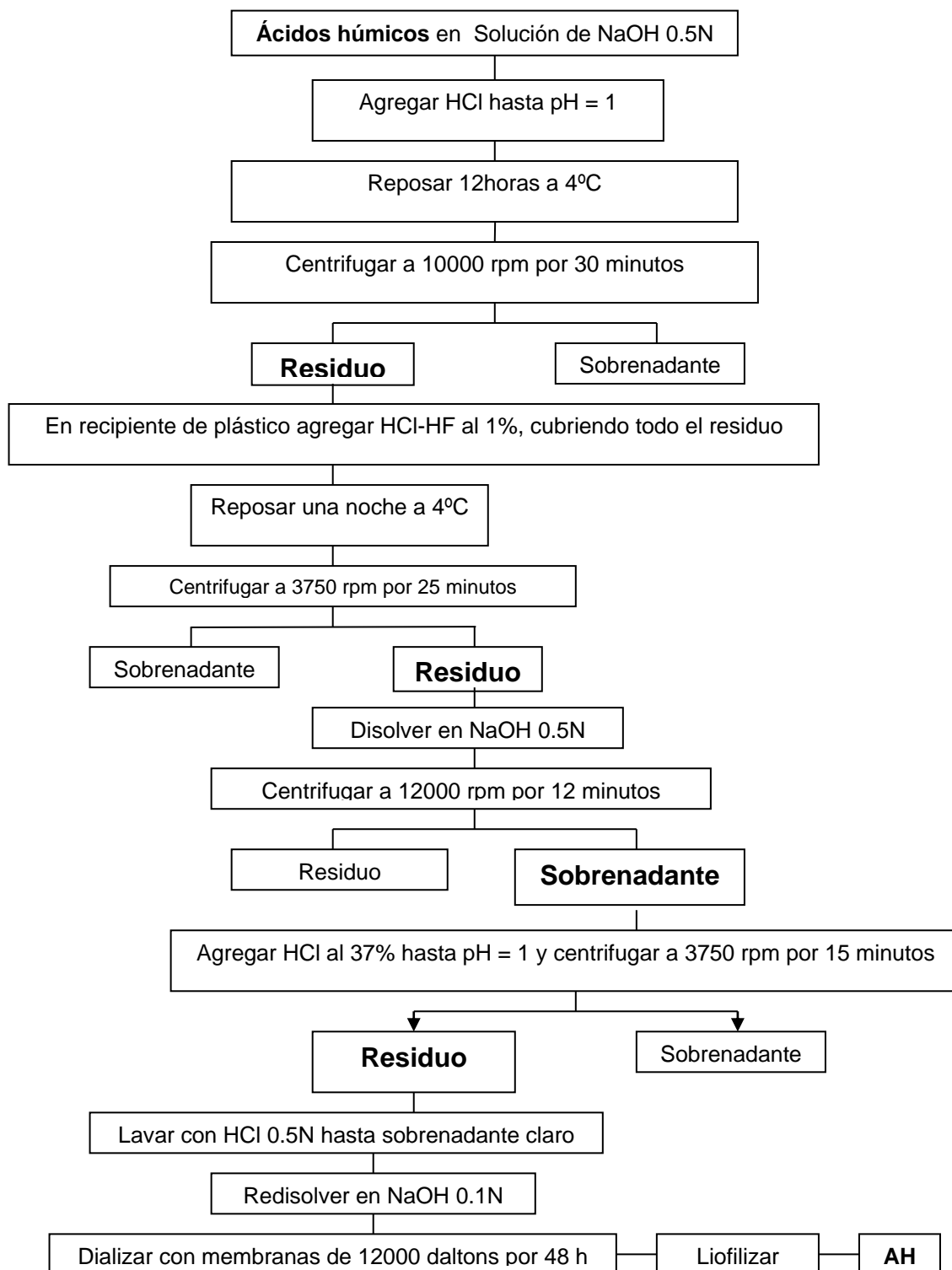


#### 5.4.3. Purificación de los ácidos húmicos

La purificación de los ácidos húmicos se realizó mediante la combinación de metodologías: centrifugación a alta velocidad, tratamiento con ácido clorhídrico-fluorhídrico para romper las uniones con compuestos inorgánicos y diálisis por 24-48 horas, utilizando membranas de celulosa de 12000 daltons, hasta obtener un cambio de pH hasta un valor ácido y eliminación de los cloruros en la solución de ácidos húmicos. Posteriormente se liofilizó la muestra con el fin de obtenerla en estado sólido para su posterior caracterización.

El diagrama número 7 describe el proceso seguido para la purificación de los ácidos húmicos.

**Diagrama 7. Purificación de los ácidos húmicos**



## **4.5. CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS**

### **4.5.1. Pruebas de solubilidad**

En la caracterización preliminar de los ácidos húmicos purificados se efectuó pruebas de solubilidad en agua, NaOH al 10%, HCl al 10% y bicarbonato de sodio al 5%, para observar el comportamiento de dichas sustancias en diferentes ambientes químicos.

### **4.5.2. Valoración de la relación E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>**

Con el objeto de obtener información sobre la aromaticidad y polidispersión de los ácidos húmicos se hizo uso de la espectroscopía UV-visible (26), determinando la relación E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub> en donde 0.001g de los ácidos húmicos purificados se llevaron a un volumen de 10mL con bicarbonato de sodio 0.05N, para medir la absorbancia de esta solución a 665 y 465nm.

### **4.5.3. Análisis por espectroscopía infrarroja**

Se empleo la espectroscopía infrarroja, para identificar las bandas características de estos compuestos, correspondientes a grupos funcionales, utilizando un espectrofotómetro con transformada de Fourier y una pastilla de la mezcla de 1mg de ácidos húmicos con bromuro de potasio al 1%.

### **4.5.4 Análisis por <sup>13</sup>C RMN**

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C permitió una identificación cualitativa y semicuantitativa de la disposición estructural preliminar y los principales grupos funcionales de los ácidos húmicos.

Los espectros de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  fueron obtenidos con un espectrofotómetro Bruker DMX 200 con CPMAS, una rampa de polarización durante el tiempo de contacto y un desacople protónico durante la adquisición. El número de escanes 32K, tiempo de contacto 2ms, anchura del barrido 1530Hz,  $90^\circ$  pulso rf,  $2.2\mu\text{s}$  de longitud y un tiempo de adquisición de 67ms. Todas las medidas fueron obtenidas a temperatura ambiente,  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4.5.1. Acetilación de los ácidos húmicos

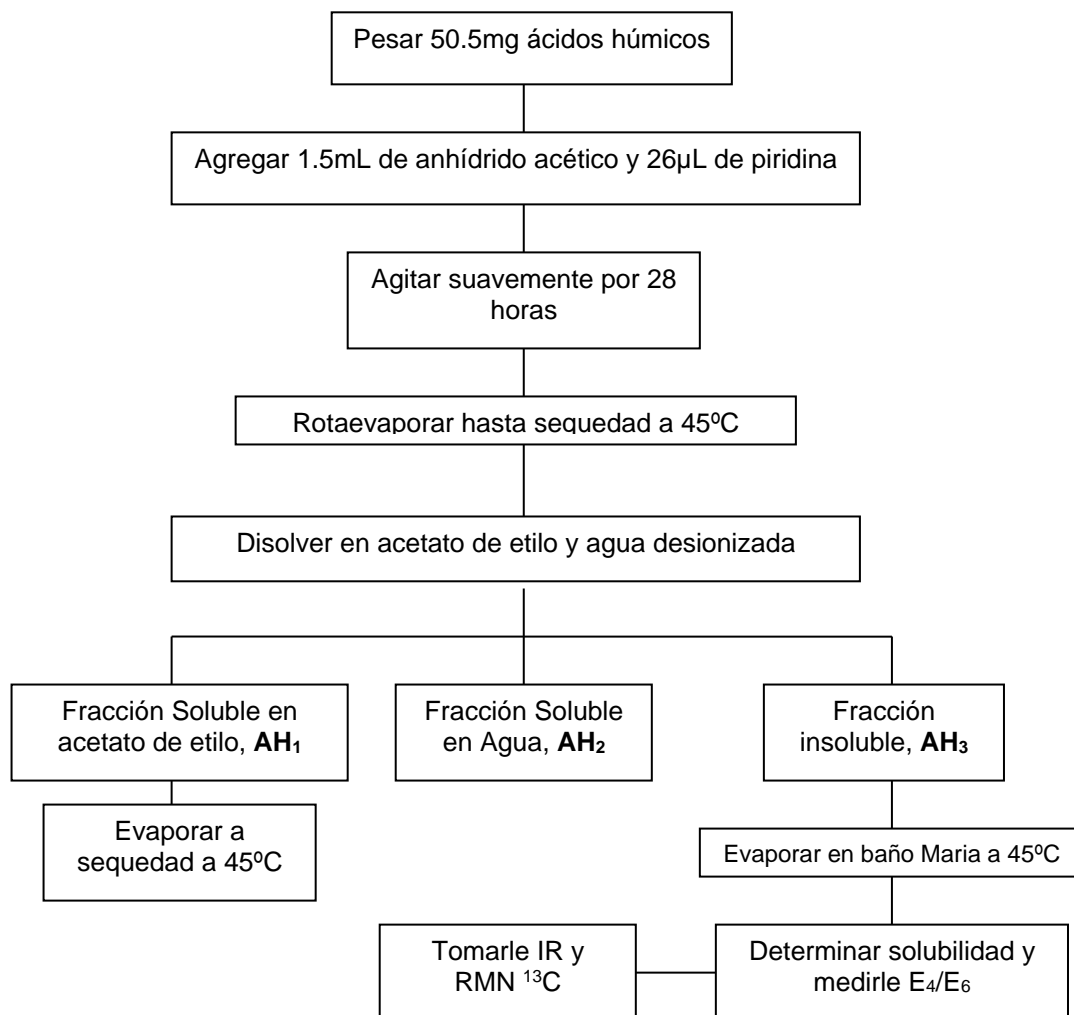
Los ácidos húmicos se acetilaron con anhídrido acético en presencia de piridina y agitación constante, con el fin de proteger los grupos  $-\text{OH}$  alcohólicos presentes en la estructura (27) y de este modo verificar su presencia y obtener información sobre el comportamiento químico y cambios estructurales de los AH.



De los diferentes productos de la acetilación, se trabajó con el denominado **AH<sub>3</sub>** (ver diagrama 8), debido a que fue el producto de mayor cantidad respecto al **AH<sub>1</sub>** y **AH<sub>2</sub>**. Al ensayar la solubilidad de **AH<sub>3</sub>** en una solución de  $\text{NaHCO}_3$  al 5% se obtuvieron dos compuestos denominados **AH<sub>3A</sub>** y **AH<sub>3B</sub>**, donde **AH<sub>3B</sub>** se divide en **AH<sub>3B1</sub>** y **AH<sub>3B2</sub>** según su solubilidad en agua.

Mediante el empleo de espectroscopía Ultravioleta-visible, infrarroja y RMN  $^{13}\text{C}$ , se corroboró algunas posiciones y presencia de dichos grupos funcionales como carboxílicos, hidroxilos, aromáticos, entre otros y la diferencia estructural entre los diferentes productos de la acetilación de los ácidos húmicos. El diagrama 8 muestra el procedimiento de forma detallada para dicha acetilación.

**Diagrama 8. Acetilación de los ácidos húmicos**



#### 4.5.2 Hidrólisis de los ácidos húmicos:

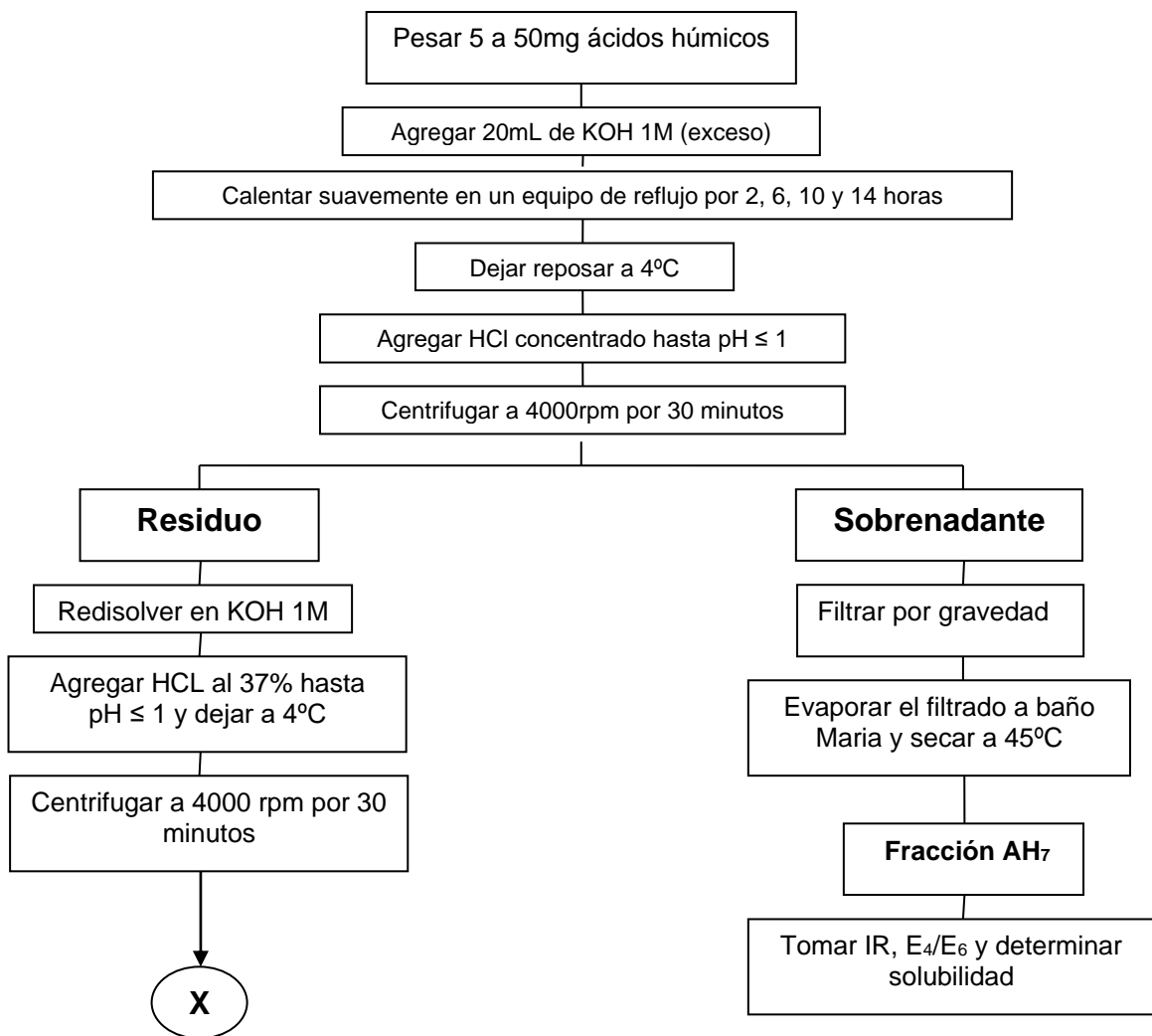
Con el objeto de separar los diferentes componentes de los ácidos húmicos y establecer el tiempo de reacción adecuado para dicha separación, los AH se hidrolizaron en medio alcalino y ácido, por calentamiento sobre reflujo, con una solución de KOH y HCL 1 M, respectivamente, por un tiempo de 2, 6, 10 y 14 horas.

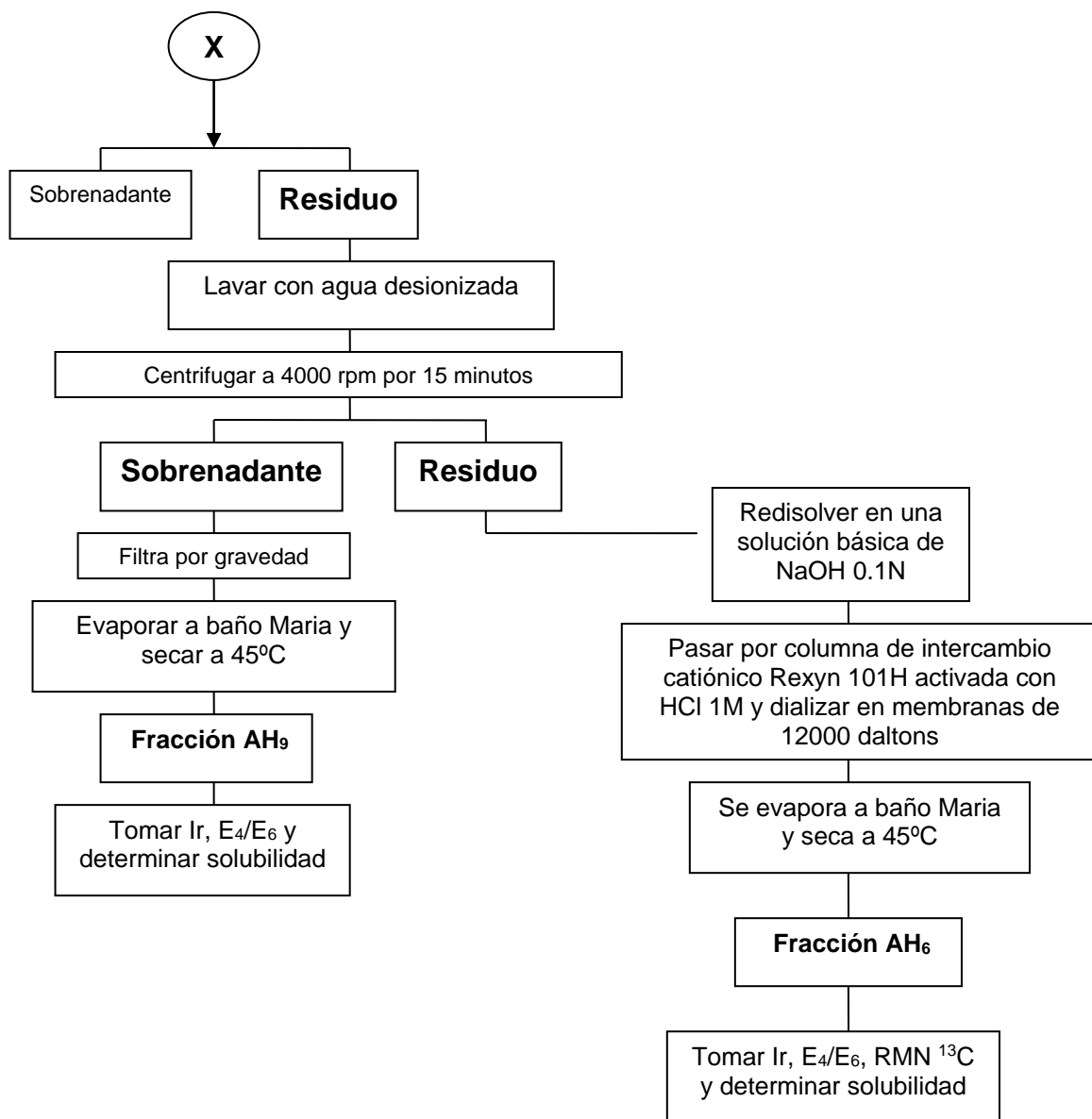


Los diagramas 9 y 10 representan esquemáticamente la hidrólisis básica y ácida de los ácidos húmicos, respectivamente.

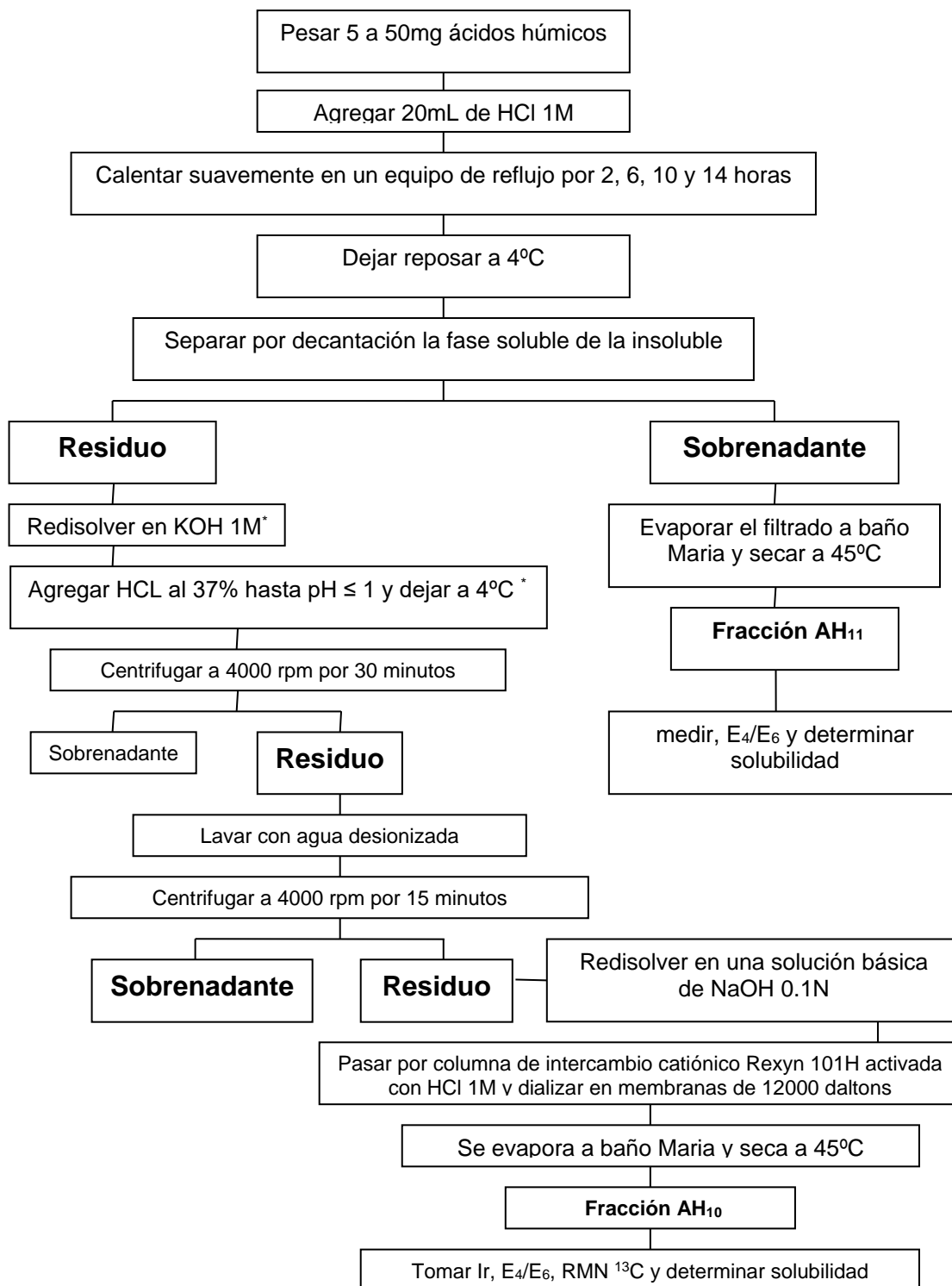
La caracterización de los diferentes productos de las hidrólisis se efectuó mediante espectroscopía de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$ , infrarroja y UV-Visible y de este modo analizar los diferentes cambios estructurales que sufren los ácidos húmicos en distintos ambiente químicos.

### Diagrama 9. Hidrólisis básica de los ácidos húmicos





**Diagrama 10. Hidrólisis ácida de los ácidos húmicos**



\*Se efectúa por duplicado

## **5. ANÁLISIS DE RESULTADOS**

### **5.1. ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DEL SUELO**

En la tabla N° 3, se recopilan los resultados para los análisis físicos y químicos realizados a la muestra de suelo empleada en esta investigación.

**Tabla 3. Análisis Físicos y Químicos Del Suelo Andisol**

PROPIEDADES FISICAS												
SUELO		HUMEDAD (%)		DENSIDAD REAL (g/mL)		GRANULOMETRÍA			TEXTURA			
						% Arenas	% Arcillas	% Limos				
ANDISOL		37.22		2.07		69.38	7.01	37.63	FRANCO ARENOSA			
PROPIEDADES QUIMICAS												
pH	% Corg	% M.O	% N	P (ppm)	C/N	Acidez Intercambiable meq/100g suelo	Al <sup>3+</sup> Intercambiable meq/100g suelo	H <sup>+</sup> Intercambiable meq/100g suelo	Capacidad de Intercambio meq/100 g suelo			
4.89	8.97	15.46	0.71	3.21	12.63	1.954	1.262	0.692	32.52			
BASES DE CAMBIO												
Calcio meq/100g	Magnesio meq/100g	Sodio meq/100g	Potasio meq/100g	Ca/Mg	Ca+Mg/K	Capacidad de Intercambio Efectiva meq/100 g suelo	% SATURACION DE BASES					
							% Saturación	% Ca	% Mg	% Na	% K	% Al
0.186	0.102	0.081	0.142	1.82	2.02	2.465	20.73	7.54	4.13	3.28	5.78	51.20

La zona rural del municipio de Cajibío (departamento del Cauca), se caracteriza por presentar suelos con una muy alta humedad que supera la capacidad de campo (29%). Al clasificarse el suelo con una textura Franco Arenosa se encuentra que las arenas, partículas mayores de 50 micras, son más del 50% (69.38%), mientras que las arcillas, partículas menores de 2 micras, solo representan el 7.01%, indicando que esa alta retención de humedad se puede atribuir al alto contenido de materia orgánica (M.O), detectado en este suelo. De igual forma se observa una baja densidad real que se correlaciona también con el alto contenido de M.O.

La muy fuerte acidez hallada para el suelo, se puede atribuir tanto a la M.O como al Aluminio intercambiable. Este último está en un nivel no tóxico y se observa una saturación media, siendo aproximadamente 2.5 veces superior a la saturación de bases, implicando una pérdida progresiva de estas, debido a extracciones continuas sin reposición o por lavado debido a la fuerte acidez, lo que se confirma porque la capacidad de intercambio efectiva es menor de 4. La deficiencia de las bases de cambio también contribuyen a la muy fuerte acidez pues se detecta valores inferiores de Ca, Mg y K, donde el nivel de Na así como su saturación son normales para este tipo de suelos. La relación Ca/Mg es inferior a 2 implicando que predomina la deficiencia de calcio y la relación Ca+Mg / K indica también fuerte deficiencia de potasio.

La capacidad de intercambio catiónico está en un nivel alto, pero como se demostró, en ella contribuye mayoritariamente la acidez intercambiable y proviene principalmente de la materia orgánica.

El alto contenido de materia orgánica, M.O (ver tabla N° 4), la acidez muy fuerte y la deficiencia de Ca y Mg impiden un adecuado proceso de mineralización y humificación, lo que conduce a una acumulación de capas sucesivas de M.O, que puede afectar la vida de los microorganismos puesto que se pueden crear condiciones de anaerobiosis y de esta manera es posible que se desarrollen microorganismos patógenos para los cultivos.

El alto porcentaje de nitrógeno (ver tabla N° 4) está relacionado con el alto contenido de M.O, pero es posible que la mayoría de este nitrógeno esté en forma orgánica y no disponible para los cultivos. El nitrógeno es un nutriente muy necesario para el crecimiento de las plantas, debido a que es el principal constituyente de las proteínas, pero es absorbido por las raíces generalmente bajo la forma de nitrato y bajo la forma del ión amonio.

La relación C/N = 12.63, indica la presencia de un alto contenido de carbono proveniente de la materia orgánica, pero al mismo tiempo indica (relación C/N menos de 30:1), que el suelo tiende a una normal mineralización, mientras que relaciones entre 20 y 30:1 no favorecen la mineralización e inmovilización del nitrógeno por igual.

Además se observa una marcada deficiencia de fósforo (ver tabla N° 4) atribuible a la fuerte acidez, implicando una fuerte adsorción sobre la fase coloidal, ya sea precipitándose en forma de compuestos insolubles de aluminio y de hierro, sustituyéndose isomórficamente sobre las arcillas o adsorbiéndose aniónicamente sobre los grupos  $-NH_3^+$  de la materia orgánica.

**Tabla 4. Valores de referencia reportados en la literatura**

DETERMINACIÓN	VALOR		
	Bajo	Medio	Alto
Nitrógeno (%)	< 0.15	0.15 a 0.25	> 0.25
Materia orgánica	2 a 5	5 a 8	8 a 15
Fósforo (ppm)	< 15	15 - 30	> 30

## 5.2 OBTENCIÓN DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS

### 5.2.1 Separación de la materia orgánica humificada (MOH) de la materia orgánica fresca (MOF)

En la obtención de los ácidos húmicos, como uno de los componentes de la materia orgánica presente en el suelo, se emplearon el método granulométrico y el densimétrico con el fin de separar la MOH, donde se encuentran las sustancias húmicas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas), de la MOF; basándose en las diferencias de tamaño y densidades de las fracciones del suelo, respectivamente.

En la tabla N° 5 se recopilan los porcentajes de rendimiento de la MOH obtenida mediante el método granulométrico, observándose que más del 50%, específicamente un 63.21%, de la materia orgánica presente en el suelo Andisol corresponde a la fracción menor de  $53\mu\text{m}$ , demostrando que hay una gran cantidad de materia orgánica humificada unida a la fracción mineral respecto a la

no humificada. Junto a la relación C/N (ver tabla 3) se puede reafirmar que el suelo tiende a una normal mineralización, donde la presencia de microorganismos juegan un rol esencial en la transformación de la MO y síntesis de nuevos productos orgánicos (sustancias húmicas).

Al combinar las dos metodologías (densimétrica y granulométrica) en la separación de la MOH de la MOF, se pretendía obtener una mayor eficiencia en dicha separación, pero a comparación de los anteriores trabajos de investigación (25), dicha eficiencia se obtuvo solamente con el método granulométrico, planteando la posibilidad de obtener adecuadamente las distintas fracciones de la materia orgánica del suelo a través de sus diferencias de tamaño, aunque el método sea más dispendioso, pero produce el mínimo de desnaturalización de las estructuras de las sustancias húmicas.

**Tabla 5. % Rendimiento con el método granulométrico para separar la MOH de la MOF en un suelo Andisol.**

<b>MUESTRA (Suelo Andisol)</b>	<b>% RENDIMIENTO</b>
1	63.12
2	68.10
3	58.42
<b>Promedio</b>	<b>63.21</b>

En la tabla N° 6 se consignan los porcentajes de Corg y MO correspondientes al suelo Andisol y a la MOH de dicho suelo, observándose un incremento considerable en el valor del %Corg y por ende en el %MO en la MOH, indicando un mayor contenido de carbono orgánico, fácilmente oxidable, en esta última fracción.

El aumento se debe posiblemente a la presencia de las sustancias húmicas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas) en la MOH y a la presencia de otros compuestos orgánicos como las proteínas, azúcares, aminoácidos, entre otros, ligados a estas sustancias. Corroborando una mayor acción microbiológica, que permite la transformación y oxidación adecuadas de la materia orgánica del suelo.



**Tabla 6. %Corg y %M.O del suelo Andisol y de la MOH del mismo suelo**

<b>MUESTRA</b>	<b>%Corg</b>	<b>%M.O</b>
<b>Suelo Andisol</b>	8.97	15.46
<b>MOH</b>	11.16	19.24

### **5.2.2 Extracción y separación de las sustancias húmicas**

Los ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas presentes en la MOH se extrajeron secuencialmente mediante el uso de tres soluciones básicas de diferentes poder (ver metodología), obteniéndose dos fracciones una soluble en medio alcalino (ácidos húmicos y fúlvicos) y las huminas insolubles en dicho medio. En donde el 50.74% correspondía a la primera y el 49.26% a la segunda fracción.

De acuerdo a los objetivos planteados para este trabajo de investigación, el análisis se basó fundamentalmente en la fracción comprendida por los ácidos húmicos y fúlvicos, separándolos respecto a su solubilidad en medio ácido en donde los ácidos fúlvicos son completamente solubles mientras que los ácidos húmicos son insolubles, obteniéndose así los ácidos húmicos para su posterior purificación y caracterización. Hay que anotar que a comparación de otros trabajos, Kang et al (2003), Davila (2002), Muñoz (2004), se mezclaron todas las fracciones obtenidas en la extracción secuencial, para obtener una sola unidad correspondiente a los ácidos húmicos (2, 21, 25).

En la tabla N° 7 se muestran los porcentajes de Corg y MO de los ácidos húmicos sin purificar. Donde el valor del %Corg comparado con el de la MOH indica la presencia de una cantidad considerable de carbono orgánico proveniente de dichos compuestos.

**Tabla 7. %Corg y %M.O de los ácidos húmicos sin purificar**

<b>MUESTRA</b>	<b>%Corg</b>	<b>%M.O</b>
<b>Ácidos húmicos</b>	3.0	5.17

Según Stevenson (1982) las sustancias húmicas usualmente son extraídas del suelo junto con componentes minerales como sales, óxidos y arcillas, Pero otros constituyentes orgánicos como proteínas y carbohidratos pueden extraerse, ya que se encuentran unidas a las sustancia húmicas por enlaces covalentes (16). Teniendo en cuenta estas consideraciones se procedió a purificar los ácidos húmicos obtenidos con el fin de eliminar o disminuir la fracción mineral extraída conjuntamente con dichos compuestos (28).

La purificación se efectuó mediante el empleo de la centrifugación a alta velocidad, tratamiento con una mezcla de HCl y HF, resinas de intercambio y diálisis (16, 29, 30, 31, 32), teniendo en cuenta que la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas ha usado una mezcla de HCl y HF en la obtención de estándares y referencias de sustancias húmicas del suelo, usando los métodos descritos por Swift (1996), (33) y en donde según las investigaciones de Sánchez et al (2002) el tratamiento HCl-HF reduce el contenido de cenizas en los ácidos húmicos sin modificar significativamente su composición y estructura química (28).

### **5.3 CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS**

La composición, estructura y conformación de la materia orgánica del suelo puede variar considerablemente dependiendo del origen y la edad de los materiales que la conforman (34), encontrándose de acuerdo a las investigaciones de Chen y Pawluk (1995), los ácidos húmicos de distintos suelos poseen diferentes composiciones y estructuras químicas (35), deduciéndose posibles variaciones en sus comportamiento físico y químico en diversos ambientes y medios de reacción.

La tabla número 8 muestra las propiedades características correspondientes a los ácidos húmicos extraídos de un suelo Andisol del Departamento del Cauca y denominados **AH**. Encontrándose que dichas sustancias, de color café oscuro, presentaron una solubilidad total en agua destilada y un pH de aproximadamente 5.0; indicando posiblemente la presencia de grupos polares como  $-OH$ ,  $COOH$ ,  $COH$ ,  $CO$ , en su estructura, los cuales forman puentes de hidrógeno con las moléculas de agua y corroborando la eliminación de cloruros e iones hidróxido, a través de la diálisis, respectivamente.

La relación E4/E6 hallada mediante espectroscopía ultravioleta-visible (ver tabla 8) de acuerdo a Kokonova (1996), permitió corroborar que los ácidos húmicos obtenidos se encuentran dentro del valor teórico (valores superiores a 5 son propios de los ácidos fúlvicos), además indica que los AH poseen una estructura donde el carbón no hace parte de grupos altamente conjugados, como los anillos

aromáticos (17), y posiblemente corresponde o hace parte de un humus muy joven, en donde hay una gran presencia de grupos alifáticos haciendo parte del cuerpo estructural de los ácidos húmicos.

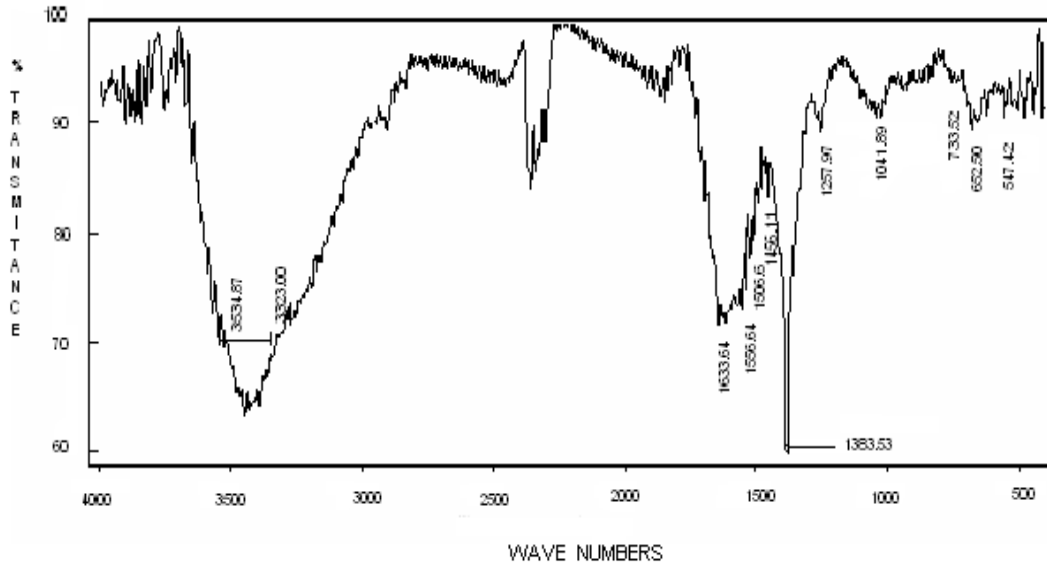
**Tabla 8. Propiedades de los ácidos húmicos extraídos de un suelo Andisol**

<b>PROPIEDAD AH</b>	<b>VALOR ó CONSIDERACIÓN</b>
Solubilidad en agua destilada	Totalmente soluble
Color	Café oscuro
pH	5.0
Relación E4/E6	4.64

Como parte fundamental en la caracterización preliminar de la estructura de los ácidos húmicos se tomó su espectro infrarrojo y de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$ , para identificar los diferentes grupos funcionales presentes y posiblemente su cuerpo estructural.

La figura N° 6 corresponde al espectro infrarrojo de los AH, en donde las bandas de absorción no son características de una sola sustancia, sino de un conglomerado de moléculas, debido a que las sustancias húmicas extraídas del suelo, y entre ellas los ácidos húmicos, no son un único compuesto químicamente puro.

Figura 6. Espectro IR de los ácidos húmicos



Las principales bandas de absorción para los AH son:

3534.87 – 3323.00  $\text{cm}^{-1}$ . Banda de absorción ancha y fuerte que posiblemente hace referencia a una tensión de grupos OH alcohólicos con enlace probablemente de hidrógeno intermolecular que corresponde a un sistema polimérico (vibración de estiramiento del H enlazado a el grupo OH). También puede aparecer en esta región el N-H libre asociado por enlaces de hidrógeno, la cual generalmente se solapa con la tensión de los OH y la vibración OH del grupo funcional – COOH.

1633.64 y 1556.64  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión C=C de un sistema aromático conjugado en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados y estiramiento aromático C=C, sales de aminas y amidas II, respectivamente

1456.11  $\text{cm}^{-1}$ . Se observan dos bandas débiles, juntas, que pueden ser atribuidas a la deformación de grupos alifáticos C-H, grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos (36).

1383.53  $\text{cm}^{-1}$ . Esta banda delgada y fuerte corresponde posiblemente a las flexiones de los O-H fenólicos presentes en la estructura.

1257.97  $\text{cm}^{-1}$ . Banda débil asociada a la tensión C-O de grupos fenólicos.

1041.89  $\text{cm}^{-1}$ . Es asignada al estiramiento C-O de polisacáridos o a uniones de componentes polisacáridos y/o impurezas de silicatos Si-O. Encontrándose que por su leve intensidad y fuerza es posible que dichas impurezas estén presentes en mínimas cantidades.

Según Kang et al (2003) las bandas que aparecen alrededor de 600  $\text{cm}^{-1}$  son asociadas con impurezas minerales desconocidas como por ejemplo silicatos u óxidos. Considerándose que posiblemente la banda a 652.50 $\text{cm}^{-1}$  corresponda a una tensión de alquenos conjugados.

El espectro de resonancia magnética nuclear carbono 13, tomado a los ácidos húmicos, figura 7, permitió deducir la estructura preliminar del esqueleto carbonado, observando los diferentes entornos magnéticos de los átomos de carbono.

Los ácidos húmicos extraídos del suelo Andisol en el municipio de Cajibío del departamento del Cauca presentaron 5 bandas bien definidas, la primera entre 20 – 40 ppm de mayor intensidad, la segunda banda entre 50 – 60 ppm, la tercera entre 70 – 80 ppm, la cuarta, banda ancha, entre 120 – 140 ppm y la quinta entre 170 – 190 ppm, las cuales corresponden respectivamente a carbonos alifáticos o parafínicos, grupos metoxi, grupos  $-\text{CH}_2\text{O}$ , grupos aromáticos y grupos carboxílicos o grupos fenólicos. La mayoría de las bandas fueron consistentes con las diferentes investigaciones realizadas sobre la materia orgánica del suelo (21, 37, 38)

El diagrama 11 presenta un resumen de los diferentes productos obtenidos de la acetilación, hidrólisis ácida, hidrólisis básica y tratamiento con etanol absoluto de los ácidos húmicos obtenidos del suelo Andisol del departamento del Cauca.

Figura 7. RMN <sup>13</sup>C de los ácidos húmicos

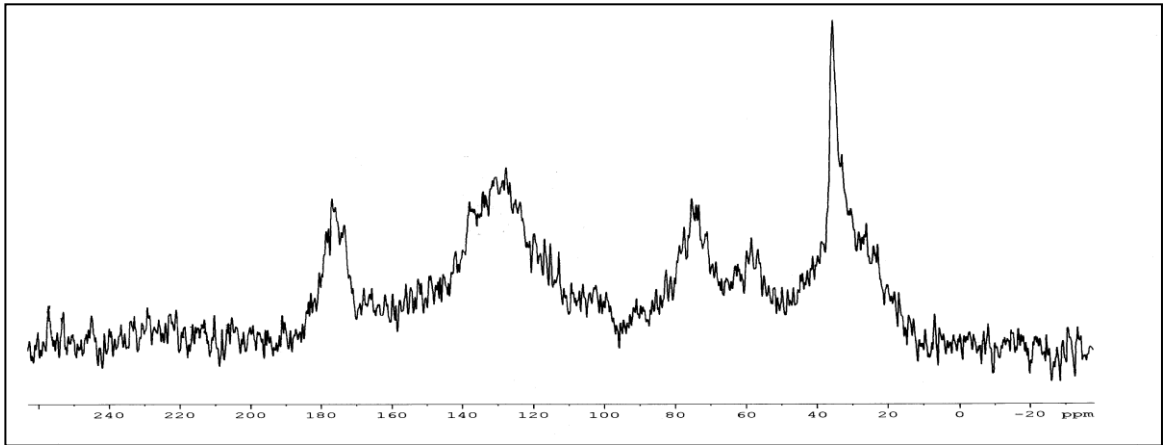
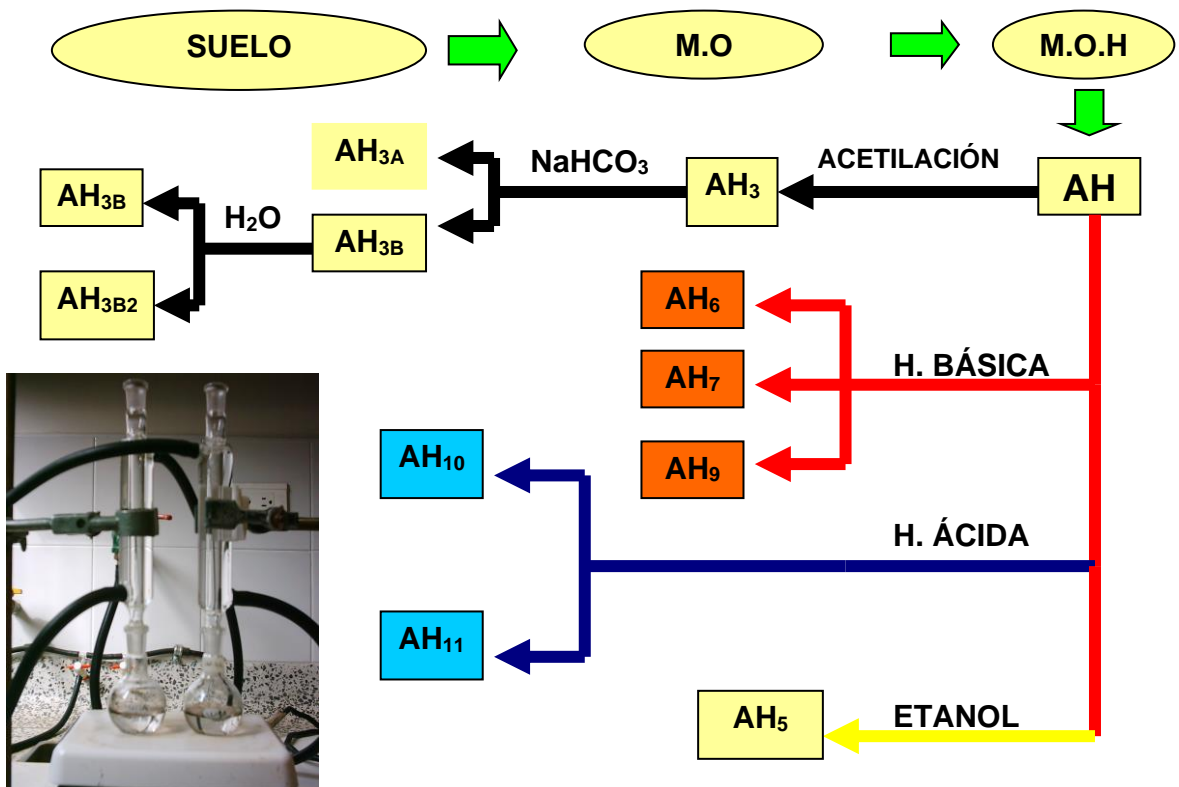


Diagrama 11. Representación esquemática de los diferentes productos obtenidos en la acetilación, hidrólisis básica, hidrólisis ácida y tratamiento con etanos de los AH



### 5.3.1 Acetilación de los ácidos húmicos

En la determinación preliminar de la estructura de los ácidos húmicos se efectuó una acetilación con anhídrido acético en presencia de piridina, con el fin de evaluar la presencia de OH fenólicos y alcohólicos primarios y secundarios, mediante espectroscopía (ultravioleta-visible, infrarroja y RMN  $^{13}\text{C}$ ) y verificar los diferentes cambios a nivel estructural.

Los ácidos húmicos acetilados,  $\text{AH}_3$ , se solubilizaron ligeramente en  $\text{NaHCO}_3$  al 5%, obteniéndose dos fases: una soluble, denominada  $\text{AH}_{3\text{A}}$  y otra insoluble, denominada,  $\text{AH}_{3\text{B}}$ ; de esta última se obtuvieron dos compuestos  $\text{AH}_{3\text{B1}}$ , soluble en agua desionizada y  $\text{AH}_{3\text{B2}}$ , insoluble. Esta última fracción  $\text{AH}_{3\text{B2}}$  no se trabajó, porque se obtuvo una mínima cantidad que no permitió realizarle los análisis correspondientes.

En la tabla N° 9 están recopilados los diferentes valores de la relación E4/E6 para el producto principal de la acetilación,  $\text{AH}_3$ , y los distintos compuestos obtenidos en la solubilización de dicho producto.

**Tabla 9. Relación E4/E6 de los compuestos AH,  $\text{AH}_3$ ,  $\text{AH}_{3\text{A}}$ ,  $\text{AH}_{3\text{B1}}$**

COMPUESTO	RELACIÓN E4/E6
AH	4.64
$\text{AH}_3$	5.36
$\text{AH}_{3\text{A}}$	7.17
$\text{AH}_{3\text{B1}}$	3.80

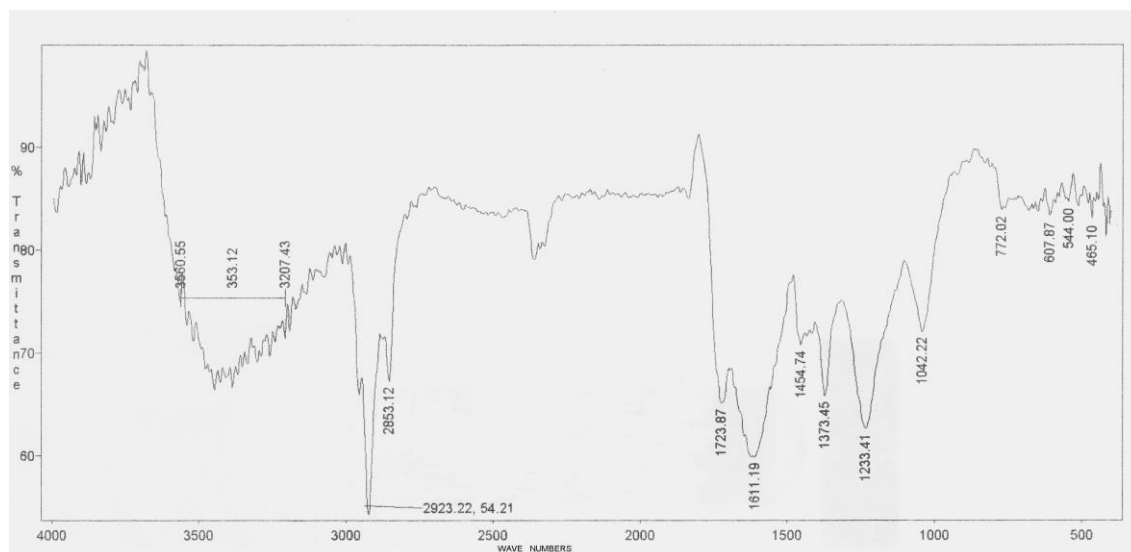
La diferencia entre los valores de la relación E4/E6 muestra los distintos grados de condensación en las moléculas de ácidos húmicos, evidenciando un aumento de estructuras alifáticas en el compuesto  $\text{AH}_3$  respecto al compuesto AH, posiblemente por la acetilación de los grupos OH fenólicos y  $-\text{CH}_2\text{OH}$  presentes en la estructura.

El compuesto AH<sub>3A</sub>, presentó una relación mayor respecto al compuesto AH<sub>3</sub>, mientras que el compuesto AH<sub>3B1</sub> tiene una relación menor, indicando posiblemente que las moléculas de AH<sub>3</sub> al solubilizarse en NaHCO<sub>3</sub> (hidrólisis básica moderada) sufrieron un rompimiento a través de sus enlaces electrostáticos o de los grupos éster presentes en la estructura, produciendo moléculas en donde los anillos aromáticos estén en menor cantidad (AH<sub>3A</sub>) y moléculas más simples con menor presencia de anillos aromáticos o otros grupos que influyen en el valor de la relación E4/E6 (AH<sub>3B1</sub>).

Los espectros infrarrojos, consignados en las figuras 8, 9 y 10, permitieron apreciar las diferencias en las bandas de absorción correspondientes a los grupos funcionales presentes en cada uno de estos compuestos, y al mismo tiempo complementar la información aportada por la relación E4/E6.

- Espectro IR para el compuesto AH<sub>3</sub>:

**Figura 8. Espectro IR del compuesto AH<sub>3</sub>**



Las principales bandas son:

3560.55 – 3207.43 cm<sup>-1</sup>. Banda ancha y débil, en comparación con la banda del espectro IR del compuesto AH. Corresponde posiblemente a la vibración OH de del grupo funcional –COOH y/o a la tensión de grupos OH fenólicos y alcohólicos que no se acetilaron.



2923.22, 2853.12  $\text{cm}^{-1}$ . Respecto al IR del compuesto AH, estas bandas angostas y medianamente fuertes, son nuevas, y corresponden a la tensión asimétrica de C-H saturado, mostrando clara evidencia de estructuras alifáticas como  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ , y a la vibración simétrica de C-H saturado de estructuras alifáticas  $\text{CH}_2$ , respectivamente. La aparición de estas bandas son una confirmación de la acetilación de los grupos OH presentes en la estructura de los AH.

1723.43  $\text{cm}^{-1}$ . Representa la tensión C=O en bandas de 1730 - 1710  $\text{cm}^{-1}$  para sistema monomérico y 1700 - 1680  $\text{cm}^{-1}$  para sistema dímero y 1725 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  para alifáticos saturados. Y es una banda nueva respecto al IR del compuesto AH que confirma la acetilación.

1611.19  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión C=C de sistema aromático conjugado en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados.

1454.74  $\text{cm}^{-1}$ . Se observa una sola banda, pequeña, que puede ser atribuida a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos.

1373.45  $\text{cm}^{-1}$ . Banda que detecta la presencia de grupos metilo correspondiente a una flexión simétrica.

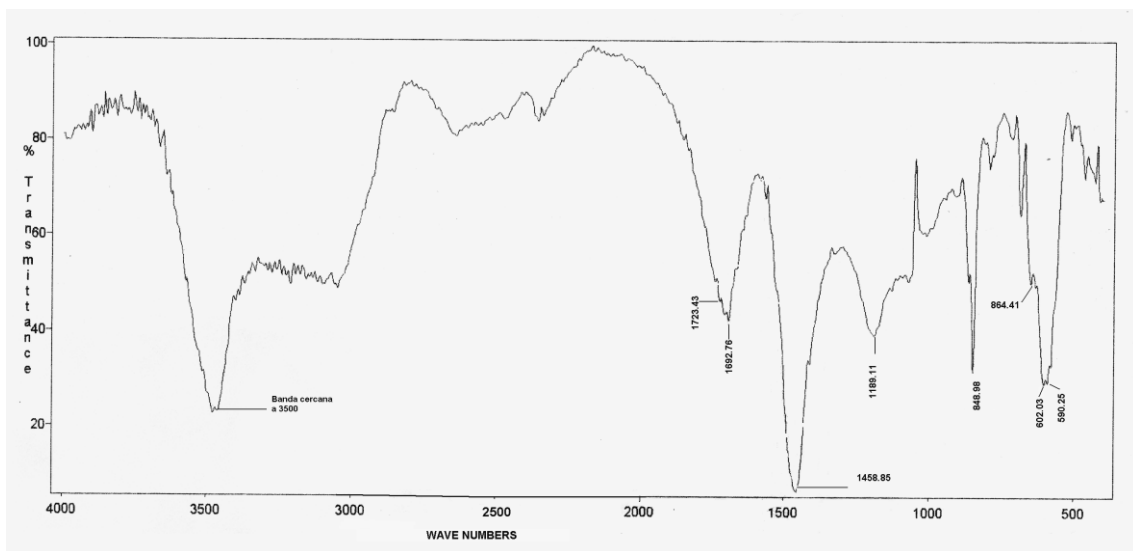
1233.41  $\text{cm}^{-1}$ . Vibraciones de C-C de cadenas alifáticas

1042.22  $\text{cm}^{-1}$ . Es asignada al estiramiento C-O de polisacáridos o a uniones de componentes polisacáridos y/o impurezas de silicatos Si-O.

772.02  $\text{cm}^{-1}$ . Vibraciones de C-H aromático fuera del plano.

- Espectro IR para el compuesto AH<sub>3</sub>A:

**Figura 9. Espectro IR del compuesto AH<sub>3</sub>A**



En este espectro no se observan las bandas correspondientes al estiramiento asimétrico y simétrico de la estructura alifática CH<sub>2</sub>. Pero se observan las siguientes bandas:

Una banda cerca de 3500cm<sup>-1</sup>, angosta e intensa, que corresponde posiblemente a una tensión del H enlazado al OH alcohólico.

Se mantienen las bandas a en una región comprendida entre 1723.43 - 1692.76 cm<sup>-1</sup> en comparación con el espectro IR del compuesto AH<sub>3</sub>, correspondiente a la tensión C=O en bandas de 1730 - 1710 cm<sup>-1</sup> para sistema monomérico y 1700 - 1680 cm<sup>-1</sup> para sistema dímero y 1725 - 1700 cm<sup>-1</sup> para alifáticos saturados, o a la tensión C=C de sistema aromático conjugado en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados. Aumenta la intensidad de la banda a 1458.85, que corresponde a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos.

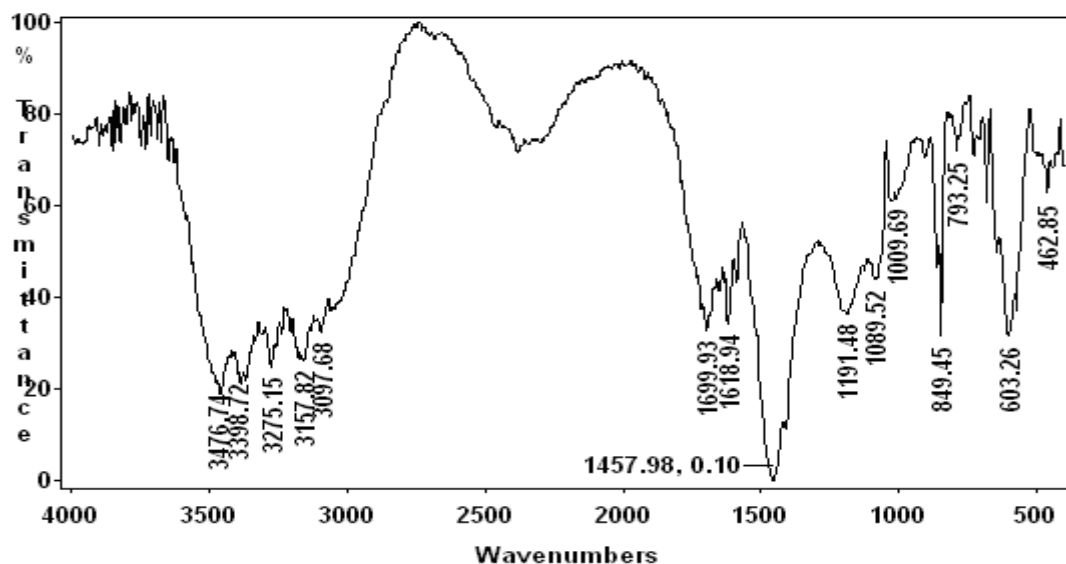
1189.11cm<sup>-1</sup>. Vibraciones C-O de grupos como polisacáridos, éster, éter o alcohol y vibraciones O-H de los alcoholes.

Para compuestos aromáticos 1,2,4 trisustituidos aparecen dos bandas a 830-800 $\text{cm}^{-1}$  y a 890-870 $\text{cm}^{-1}$ . Observándose en el espectro la presencia de estas dos bandas 864.41 Y 848.98  $\text{cm}^{-1}$ . Donde la banda a 864.41 $\text{cm}^{-1}$ , también puede corresponder a compuestos aromáticos 1,2,4,5 tetrasustituidos (870-855  $\text{cm}^{-1}$ ).

648.27  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión de alquenos conjugados.

- Espectro para el compuesto AH<sub>3B1</sub>:

**Figura 10. Espectro IR del compuesto AH<sub>3B1</sub>**



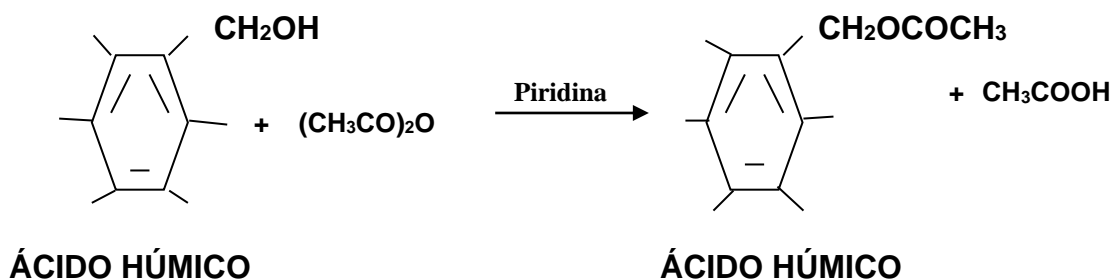
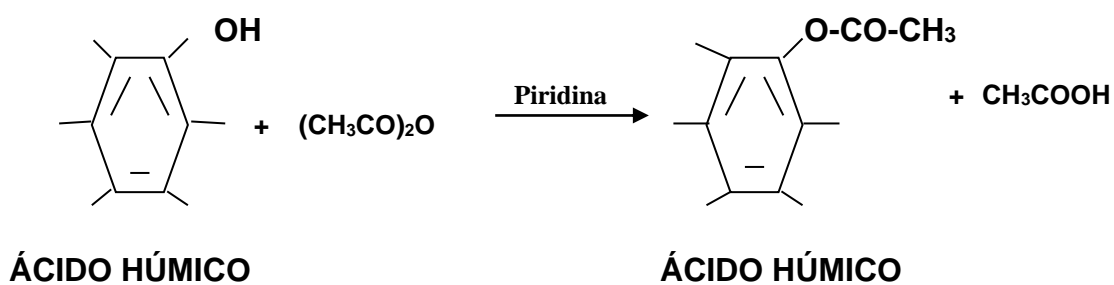
En comparación con los espectros infrarrojos de los compuestos AH<sub>3</sub> y AH<sub>3A</sub>, en la región de 3500-3000 $\text{cm}^{-1}$ , se observa una gran cantidad de bandas que corresponden posiblemente a las vibraciones causadas por el estiramiento del H unido a grupos OH. Además la banda a 3047.72 $\text{cm}^{-1}$  es característica del C-H aromático y la banda a 1618.94 $\text{cm}^{-1}$  es asignada al estiramiento C=C de los grupos aromáticos, corroborándose por su intensidad débil la poca presencia de dichos grupos. La banda, fuerte, a 1457.98 puede ser atribuida a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos.

Y la banda a 603.26  $\text{cm}^{-1}$  puede ser asociada con impurezas minerales desconocidas como por ejemplo silicatos u óxidos, teniendo en cuenta que aún no

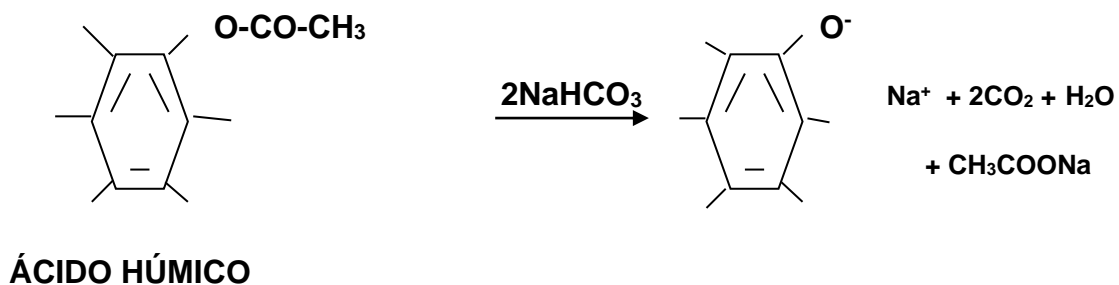
se cuenta con una metodología adecuada para su purificación, al igual que para el compuesto AH<sub>3A</sub>, encontrándose de este modo en forma de sales.

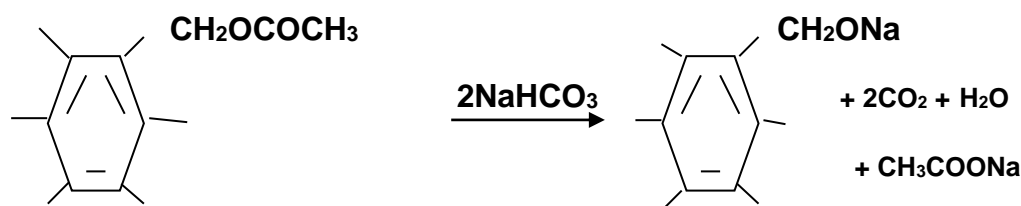
De acuerdo a lo anteriormente planteado, se propone una posible reacción para la acetilación de los ácidos húmicos y para los ácidos húmicos acetilados con NaHCO<sub>3</sub> al 5% (figura 11).

**Figura 11. Posible reacción de acetilación para los ácidos húmicos**



**Posible reacción para los ácidos húmicos acetilados con NaHCO<sub>3</sub> al 5%**

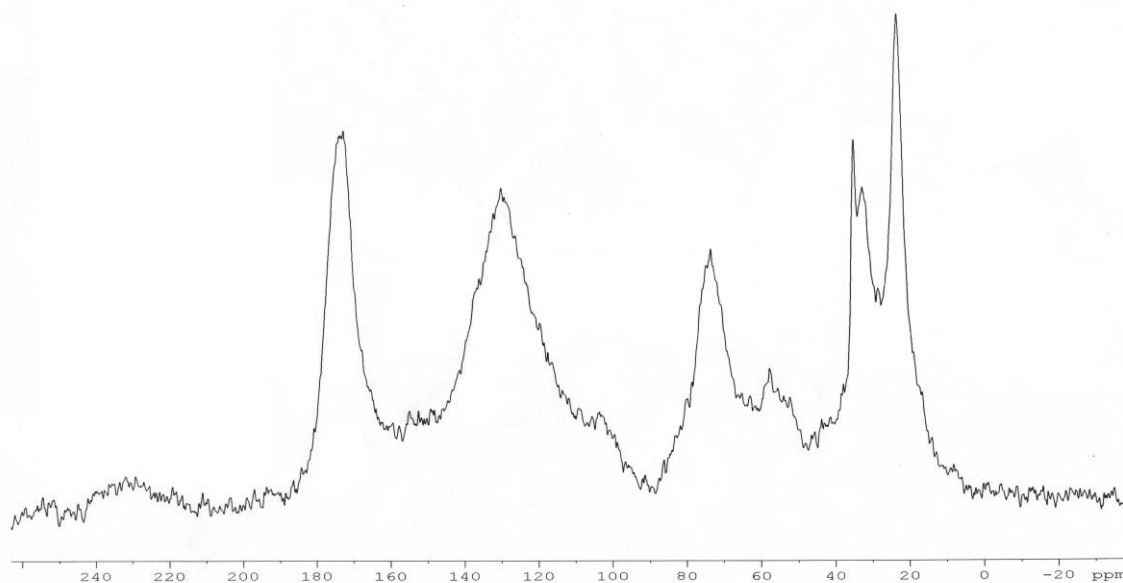




## ÁCIDO HÚMICO

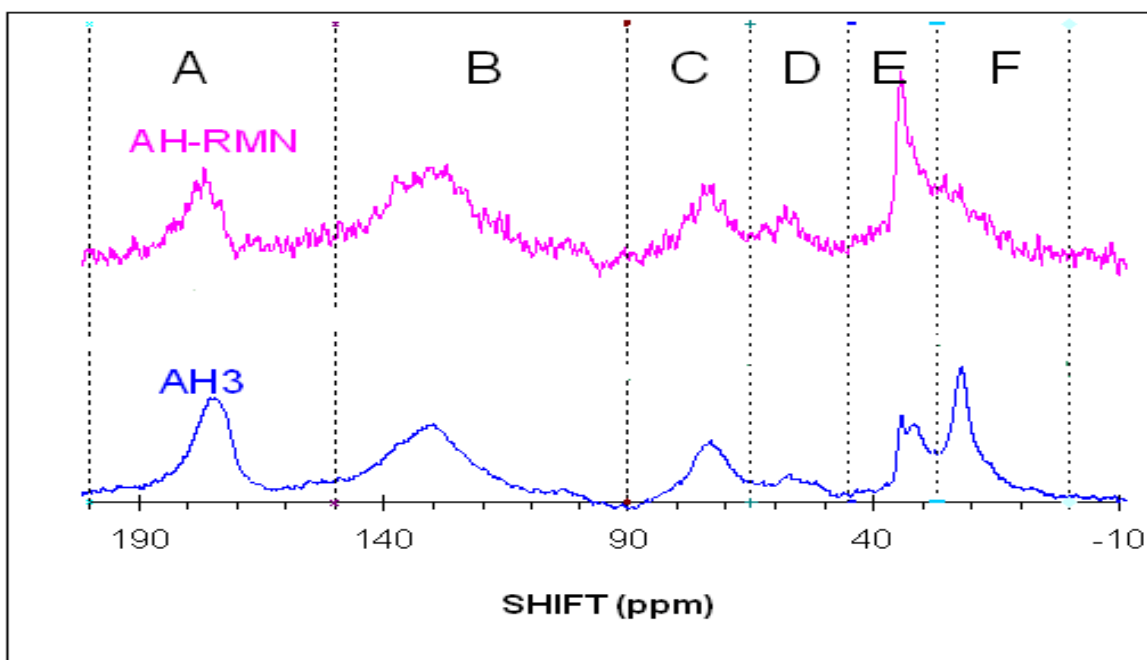
Respecto al espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto AH<sub>3</sub> (figura 12), se observó que los ácidos húmicos acetilados presentaron diferencias notorias frente a los ácidos húmicos, porque las bandas son más definidas y en la región de 10-40 ppm aparece una nueva banda de intensidad considerable. Se notan seis bandas bien definidas en la región de 10 – 40 ppm dos bandas, correspondientes a carbonos alifáticos, posiblemente CH<sub>3</sub> o carbonos parafínicos; en la región de 50 – 60 ppm se observa una banda muy débil correspondiente a los grupos metoxi; en la región de 60 – 90 ppm hay una banda correspondiente a los grupos – CH<sub>2</sub>O; en la región de 110 – 140 ppm hay una banda ancha correspondiente a los grupos aromáticos y en la región de 160 – 180 ppm hay una banda intensa correspondiente a los grupos carboxílicos presentes en los ácidos húmicos acetilados, los cuales aumentan en cantidad. Además se observa un hombro a 105 ppm del carbón anomérico de los carbohidratos y una pequeña banda a 152 ppm del oxígeno sustituido de los carbonos aromáticos (39).

**Figura 12. Espectro  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto AH<sub>3</sub>**



La figura 13 muestra conjuntamente los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN de los compuestos AH y AH<sub>3</sub>, para demostrar gráficamente las diferencias considerables entre ambos compuestos y la tabla 10 recopila el porcentaje de distribución de la intensidad de los dos compuestos. Se observa una disminución en las variables de intensidad en los grupos aromáticos (región B), un aumento en los grupos carboxílicos y alifáticos (región A y F, respectivamente) y una disminución no muy considerable de los grupo metoxi (región D) en el compuesto AH<sub>3</sub>, respecto al AH.

**Figura 13. Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  de dos compuestos AH, AH<sub>3</sub>**



**Tabla 10. Distribución de Intensidad de RMN  $^{13}\text{C}$  de dos compuestos AH, AH<sub>3</sub>**

REGIÓN ppm	AH (%)	AH <sub>3</sub> (%)
A	18	26
B	33	29
C	11	10
D	8	6
E	17	11
F	12	17

### 5.3.2 Hidrólisis básica y ácida de los ácidos húmicos

Como parte de la caracterización preliminar de la estructura de los ácidos húmicos provenientes de un suelo Andisol se llevaron a cabo una hidrólisis básica y ácida obteniéndose dos productos principales AH<sub>6</sub> y AH<sub>10</sub>, respectivamente.

- **Hidrólisis básica:**

En la hidrólisis básica se obtuvieron tres productos: AH<sub>6</sub>, AH<sub>7</sub> y AH<sub>9</sub>, donde los dos últimos se generaron durante el proceso de purificación del compuesto AH<sub>6</sub>. Se evaluaron los diferentes cambios estructurales que sufrían los ácidos húmicos a través del tiempo, por medio de una cinética de reacción monitoreada mediante espectroscopía de ultravioleta-visible e infrarroja, encontrándose cambios considerables en la relación E4/E6 de los productos en los diferentes tiempos de reacción (ver tabla 11 y figura 14).

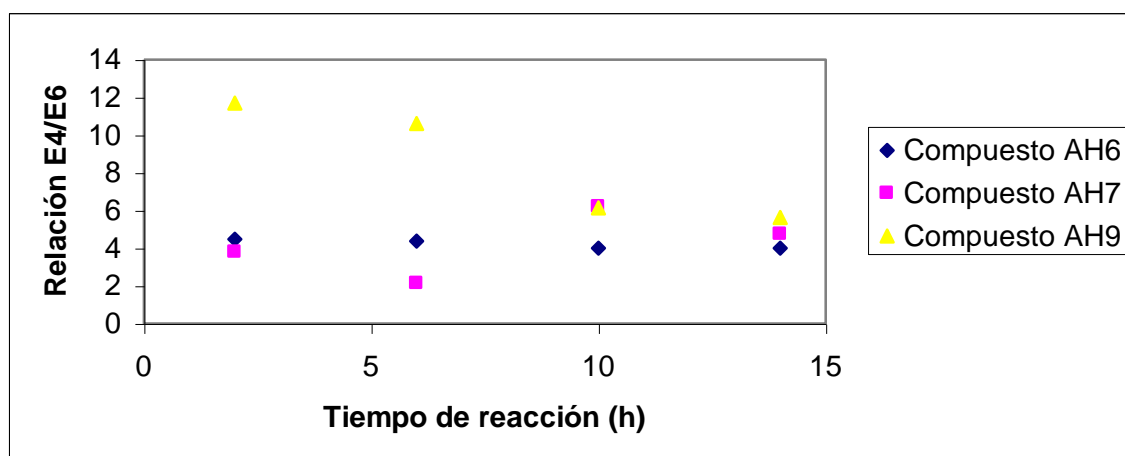
Al aumentar el tiempo de reacción los valores de la relación E4/E6 para el compuesto AH<sub>6</sub> disminuye, aumentándose el carbón que hace parte de estructuras más condensadas. De acuerdo con los valores de la relación E4/E6 para los compuestos AH<sub>7</sub> y AH<sub>9</sub> se puede considerar que corresponde a moléculas de diferente tamaño y condensación que hacen parte de la estructura de los ácidos húmicos, observándose que hay una fluctuación en los valores del compuesto AH<sub>7</sub>, debida posiblemente al tiempo de reacción, que produce diferentes tipos de moléculas.

**Tabla 11. Relación E4/E6 de los compuestos AH<sub>6</sub>, AH<sub>7</sub> y AH<sub>9</sub> a diferentes tiempos de reacción.**

Tiempo de reacción	Compuesto	Relación E4/E6
2 horas	AH <sub>6(1)</sub>	4.48
	AH <sub>7(1)</sub>	3.81
	AH <sub>9(1)</sub>	11.7
6 horas	AH <sub>6(2)</sub>	4.37
	AH <sub>7(2)</sub>	2.12
	AH <sub>9(2)</sub>	10.6

10 horas	AH <sub>6</sub> (3)	4.0
	AH <sub>7</sub> (3)	6.2
	AH <sub>9</sub> (3)	6.14
14 horas	AH <sub>6</sub> (4)	4.0
	AH <sub>7</sub> (4)	4.75
	AH <sub>9</sub> (4)	5.63

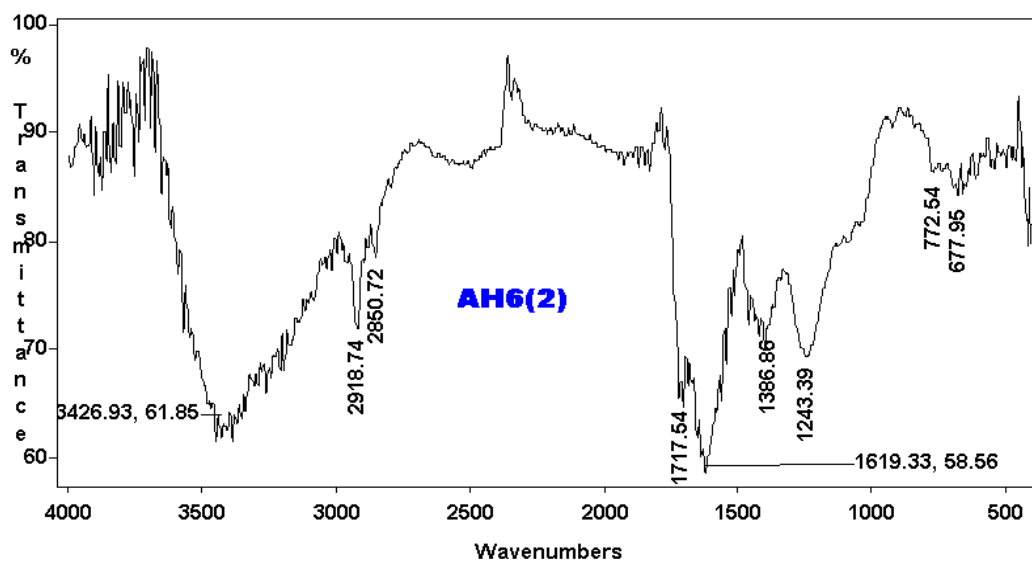
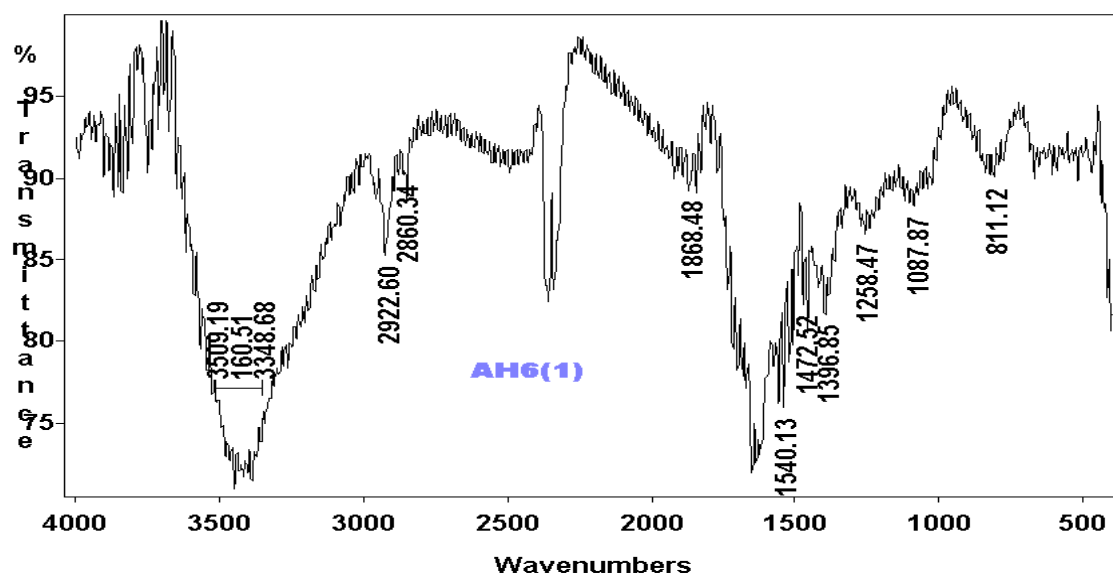
**Figura 14. Gráfica relación E4/E6 vs. Tiempo de reacción en la hidrólisis básica**

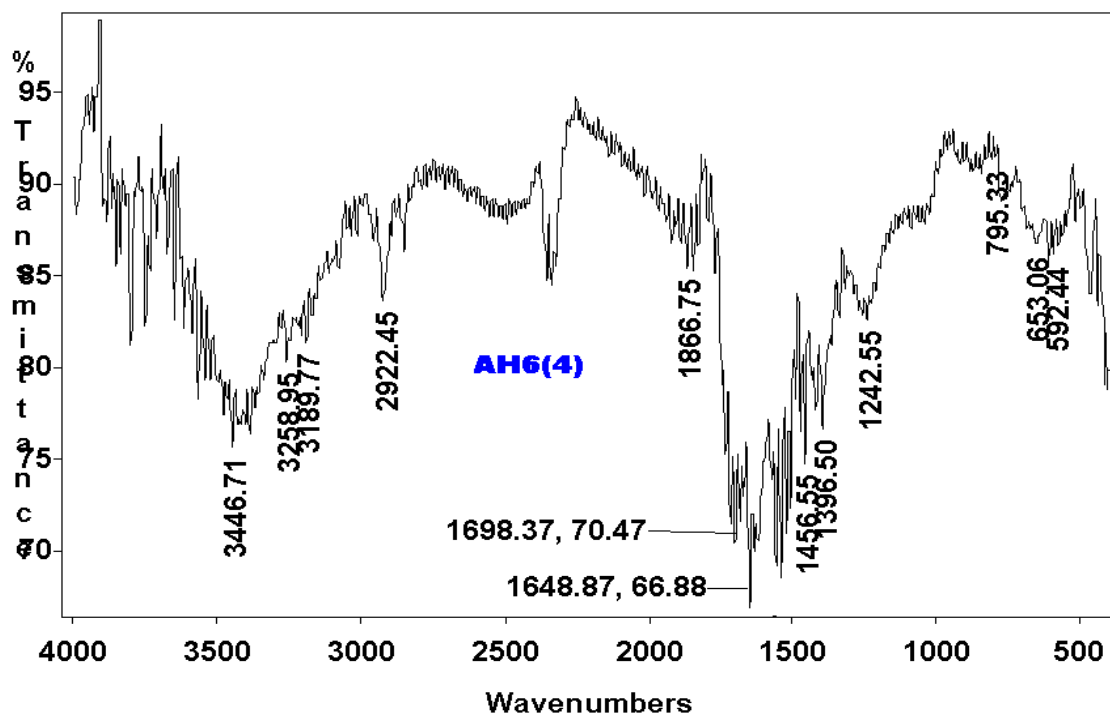
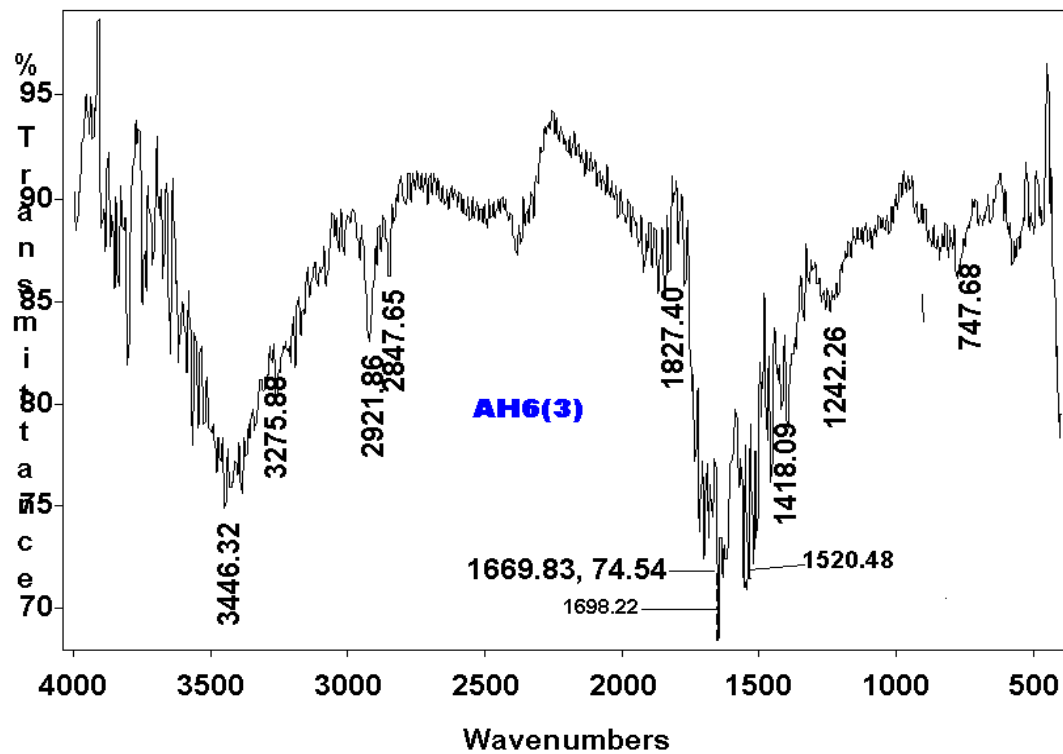


La espectroscopía infrarroja ha sido ampliamente empleada para la caracterización de las sustancias húmicas y puede proveer información valiosa sobre las propiedades estructurales y funcionales de la materia orgánica del suelo (40). Los espectros infrarrojos para el producto AH<sub>6</sub> a diferentes tiempos de reacción son presentados en la figura 15



Figura 15. Espectros IR del compuesto AH<sub>6</sub> a diferentes tiempos de reacción.





Los cuatro espectros presentan bandas integradas en las regiones:

3535 – 3188  $\text{cm}^{-1}$ . Banda fuerte que corresponde posiblemente a una tensión de grupos OH alcohólicos con enlace probablemente de hidrógeno intermolecular de un sistema polimérico. También puede aparecer en esta región el N-H libre asociados por enlaces de hidrógeno, la cual generalmente se solapa con la tensión de los OH. A medida que transcurre el tiempo de reacción hay una disminución en el porcentaje de transmitancia, %T, la absorción aumenta y por ende la concentración del grupo funcional entre el compuesto AH<sub>6(1)</sub> y AH<sub>6(2)</sub>, aumentando dicho porcentaje entre los compuestos AH<sub>6(2)</sub> y AH<sub>6(3)</sub> y siendo constante entre los compuestos AH<sub>6(3)</sub> y AH<sub>6(4)</sub>.

2923 – 2828  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas de intensidad media. Tensión asimétrica de C-H saturado, mostrando clara evidencia de estructuras alifáticas como CH<sub>2</sub> y CH<sub>3</sub>, observándose el mismo comportamiento descrito anteriormente.

2851 – 2828  $\text{cm}^{-1}$ . Vibración simétrica de C-H saturado de estructuras alifáticas CH<sub>2</sub>, donde las bandas presentan una intensidad débil y una disminución en el %T entre los compuestos AH<sub>6(1)</sub> y AH<sub>6(2)</sub> y posteriormente un aumento.

1702 – 1697  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles correspondientes a la tensión C=O en bandas de 1730 - 1710  $\text{cm}^{-1}$  para sistema monomérico y 1700 - 1680  $\text{cm}^{-1}$  para sistema dímero y 1725 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  para alifáticos saturados. Comportamiento similar al descrito inicialmente.

1680 – 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión C=C de sistema aromático conjugado en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados. Bandas moderadamente fuertes. Comportamiento similar al descrito inicialmente.

1540 – 1520  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles que corresponden a las vibraciones del anillo en compuestos aromáticos orto – sustituidos (41). El %T disminuye muy poco entre AH<sub>6(1)</sub> y AH<sub>6(2)</sub> y luego es constante.

1457 – 1418  $\text{cm}^{-1}$ . Las dos bandas débiles atribuidas a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos, se encuentran sólo en los espectros de los compuestos AH<sub>6(1)</sub>, AH<sub>6(3)</sub> y AH<sub>6(4)</sub>. Observándose una disminución leve en el %T.

1259 – 1242  $\text{cm}^{-1}$ . Banda débil en los espectros de los compuestos  $\text{AH}_{6(1)}$ ,  $\text{AH}_{6(3)}$  y  $\text{AH}_{6(4)}$  y medianamente fuerte en  $\text{AH}_{6(2)}$ . Vibraciones de C-C de cadenas alifáticas o estiramiento de C-O, deformación de OH y COOH y estiramiento de aril éteres. El %T disminuye entre  $\text{AH}_{6(1)}$  y  $\text{AH}_{6(2)}$  y luego es constante.

Además se evaluó la solubilidad en diferentes medios, encontrándose una insolubilidad en agua y HCl al 10%, y una solubilidad en NaOH al 10%, que se debe posiblemente a la disminución de los grupos polares o a su transformación; evidenciándose un aumento en el %T en los espectros infrarrojos de los compuestos  $\text{AH}_{6(1,2,3,4)}$  respecto al espectro del compuesto AH.

La tabla N° 12 contiene las distintas valoraciones respecto a la solubilidad del compuesto  $\text{AH}_{6(1,2,3,4)}$ .

**Tabla 12. Solubilidad de los compuestos  $\text{AH}_{6(1,2,3,4)}$**

Compuesto	Agua	NaOH al 10%	HCl al 10%
$\text{AH}_{6(1)}$	Insoluble	Soluble	Insoluble
$\text{AH}_{6(2)}$	Insoluble	Soluble	Insoluble
$\text{AH}_{6(3)}$	Insoluble	Soluble	Insoluble
$\text{AH}_{6(4)}$	insoluble	soluble	Insoluble

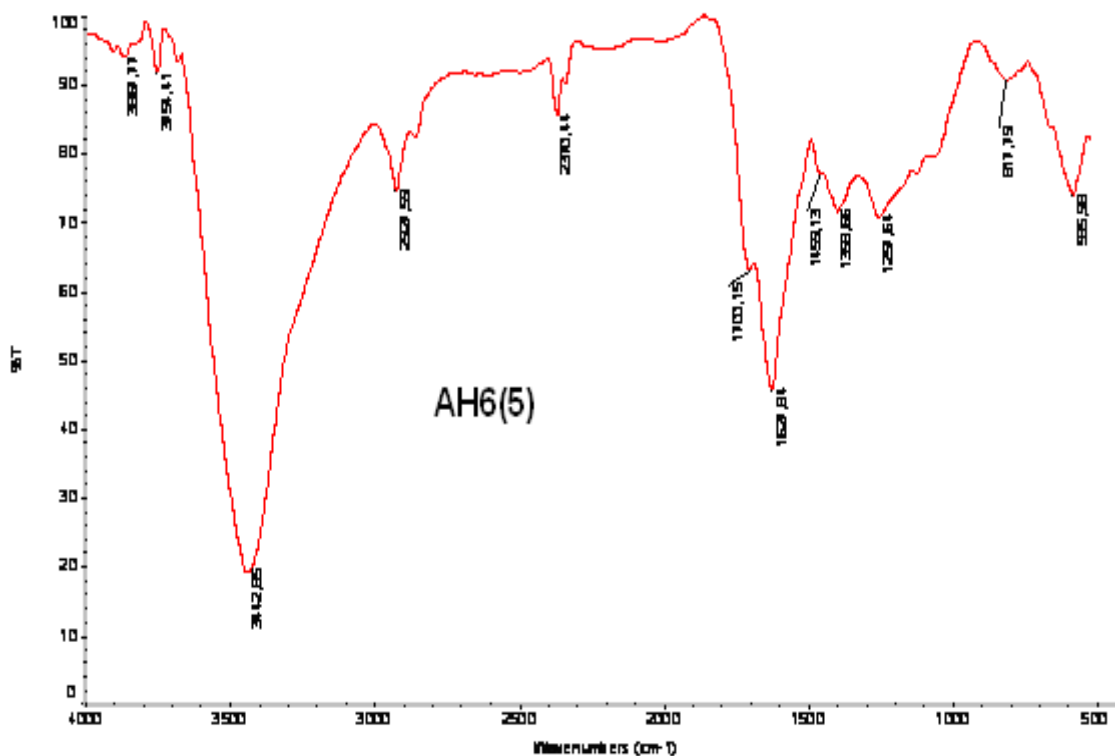
Teniendo presente los valores de las relaciones E4/E6 para los diferentes compuestos  $\text{AH}_6$ , se procedió a hidrolizar una muestra de aproximadamente 50mg de ácidos húmicos durante 14 horas, para determinar por espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  RMN los cambios estructurales. Se encontró, de acuerdo a la tabla 13, que un factor influyente en los valores de las relaciones E4/E6 es la cantidad de muestra que se emplea en la hidrólisis, porque en la cinética se empleó aproximadamente 5mg.

**Tabla 13. Relación E4/E6 de los compuestos  $\text{AH}_6$ ,  $\text{AH}_7$  y  $\text{AH}_9$**

Compuesto	Relación E4/E6
$\text{AH}_{6(5)}$	4.20
$\text{AH}_{7(5)}$	9.0
$\text{AH}_{9(5)}$	8.12

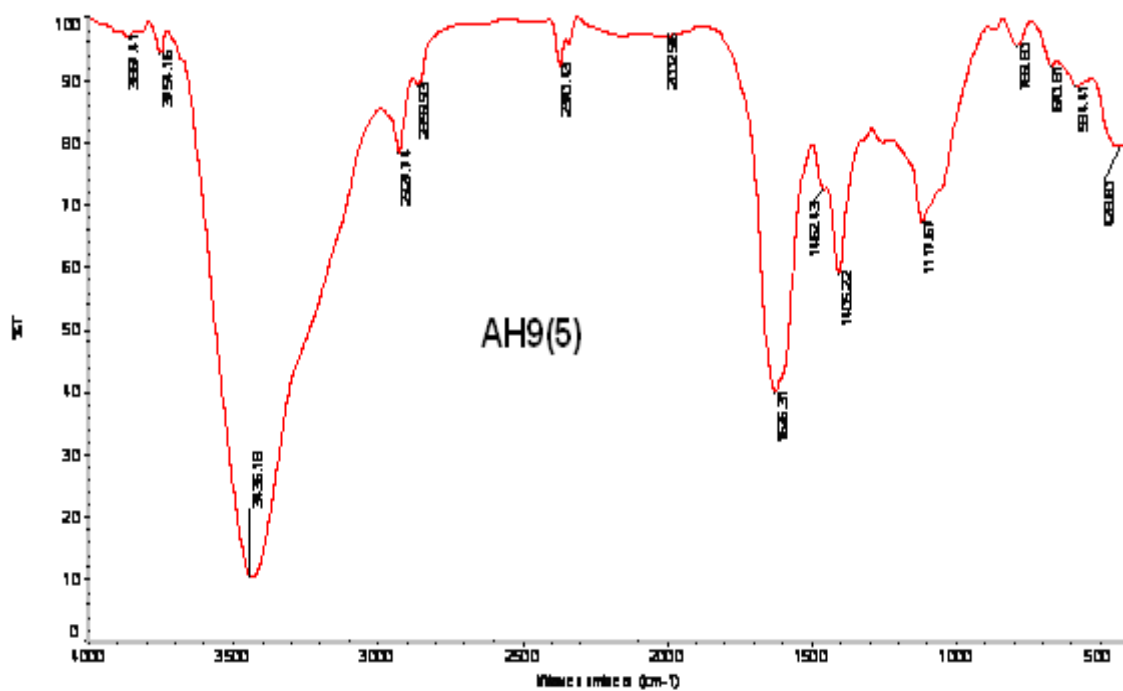
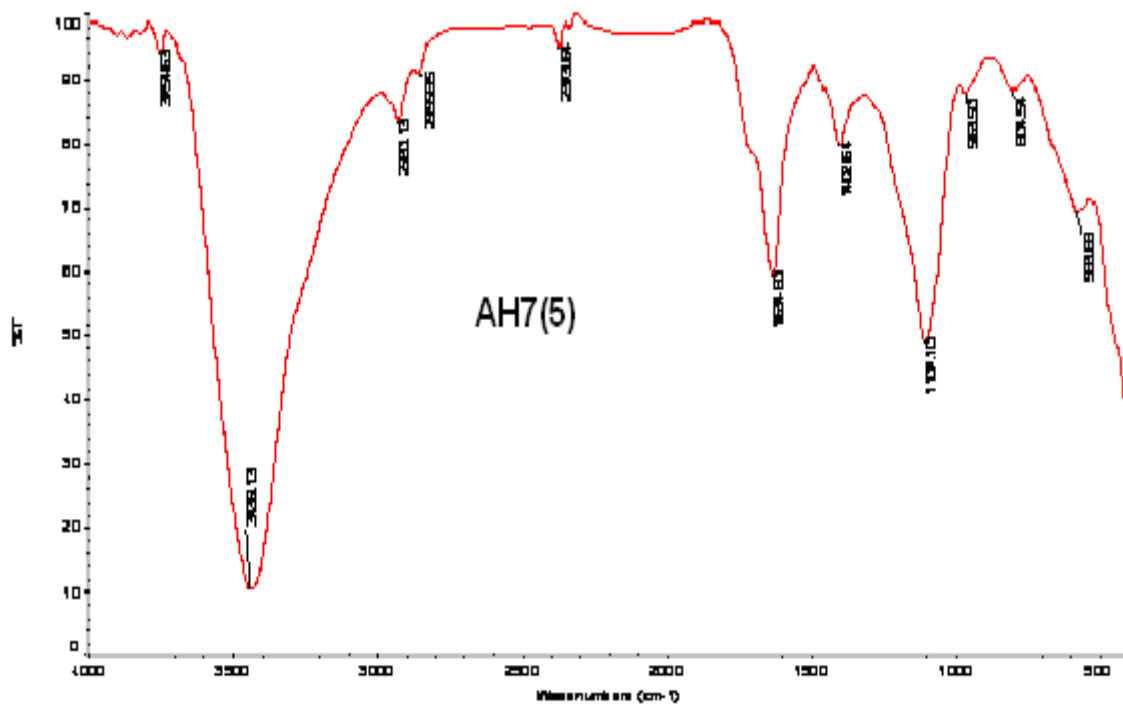
El compuesto AH<sub>6(5)</sub> no presentó cambios muy considerables en su espectro infrarrojo, encontrándose bandas muy similares a 3442.85, 2927.59, 1700.15, 1627.84, 1459.13 y 1257.67 cm<sup>-1</sup>, respecto al compuesto AH<sub>6(4)</sub>, diferenciándose en el %T y por ende en la concentración de los diferentes grupos funcionales que conforman la estructura de dichos compuestos. La figura 16 muestra el espectro IR para el compuesto AH<sub>6(5)</sub>.

**Figura 16. Espectro IR del compuesto AH<sub>6(5)</sub>.**



Los compuestos AH<sub>7(5)</sub> y AH<sub>9(5)</sub> se encuentran en forma salina y sus bandas características son: 3439 – 3436cm<sup>-1</sup>, 2930 – 2855cm<sup>-1</sup>, 1634 – 1626cm<sup>-1</sup>, 1405 – 1402cm<sup>-1</sup>, y 1117 - 1107 cm<sup>-1</sup> correspondientes a las vibraciones de los grupos OH; C-H; C=C; O-H, COO y C-O; y C-O de polisacáridos o a uniones de componentes polisacáridos y/o impurezas de silicatos Si-O, respectivamente (figura 17)

Figura 17. Espectros infrarrojos de los compuestos AH7 (5) y AH9 (5).



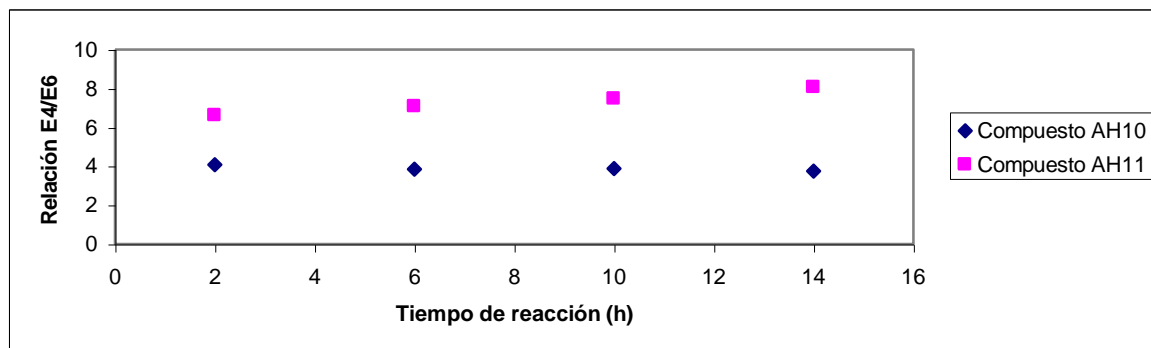
- **Hidrólisis ácida:**

Al igual que en la hidrólisis básica, en la hidrólisis ácida, se efectuó una cinética de reacción monitoreándola a través del empleo de la espectroscopía ultravioleta-visible e infrarroja, para comparar los cambios a nivel estructural entre ambas metodologías. Los compuestos obtenidos se denominaron AH<sub>10</sub> (fracción insoluble en ácido) y AH<sub>11</sub> (fracción soluble en ácido) y los valores de la relación E4/E6 están consignados en la tabla N° 14 y figura N° 18. Donde se observa que a medida que incrementa el tiempo de reacción, disminuye el valor de la relación E4/E6 en el compuesto AH<sub>10</sub>, aún cuando entre el tiempo de reacción de 6 y 10 horas hay un leve incremento, no significativo, obteniéndose un valor menor para las 14 horas de reacción, respecto al valor en la hidrólisis básica. Indicando que a medida que aumenta el tiempo de reacción se obtienen moléculas más condensadas; mientras que para el compuesto AH<sub>11</sub> el valor incrementa con el incremento del tiempo de reacción, siendo similar a una estructura de ácido fúlvico que presenta menor condensación.

**Tabla 14. Relación E4/E6 para los compuestos AH<sub>10(1,2,3,4)</sub> y AH<sub>11(1,2,3,4)</sub>**

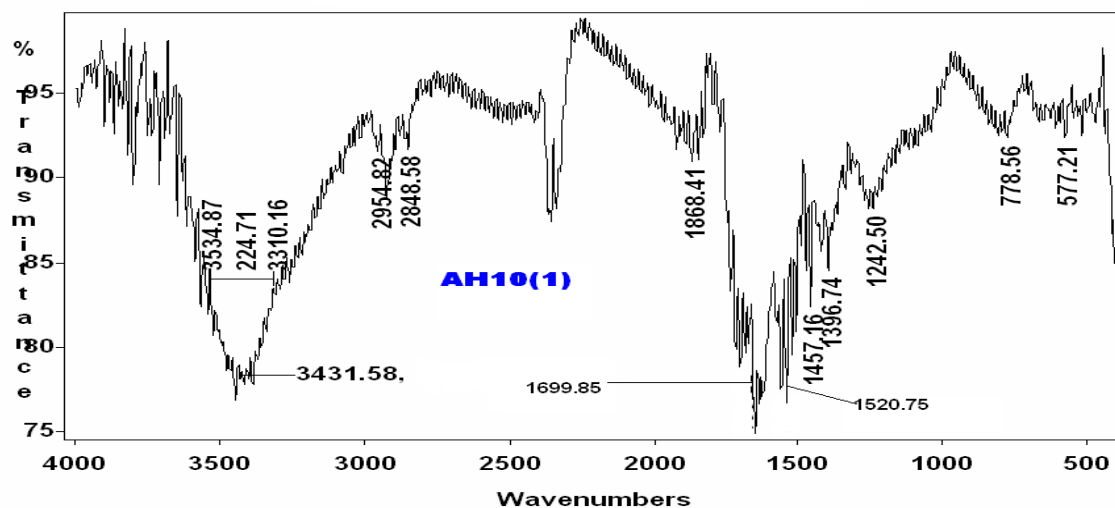
Tiempo de reacción	Compuesto	Relación E4/E6
2 horas	AH <sub>10(1)</sub>	4.07
	AH <sub>11(1)</sub>	6.61
6 horas	AH <sub>10(2)</sub>	3.86
	AH <sub>11(2)</sub>	7.07
10 horas	AH <sub>10(3)</sub>	3.89
	AH <sub>11(3)</sub>	7.46
14 horas	AH <sub>10(4)</sub>	3.74
	AH <sub>11(4)</sub>	8.07

**Figura 18. Gráfica relación E4/E6 vs. Tiempo de reacción para la hidrólisis ácida**

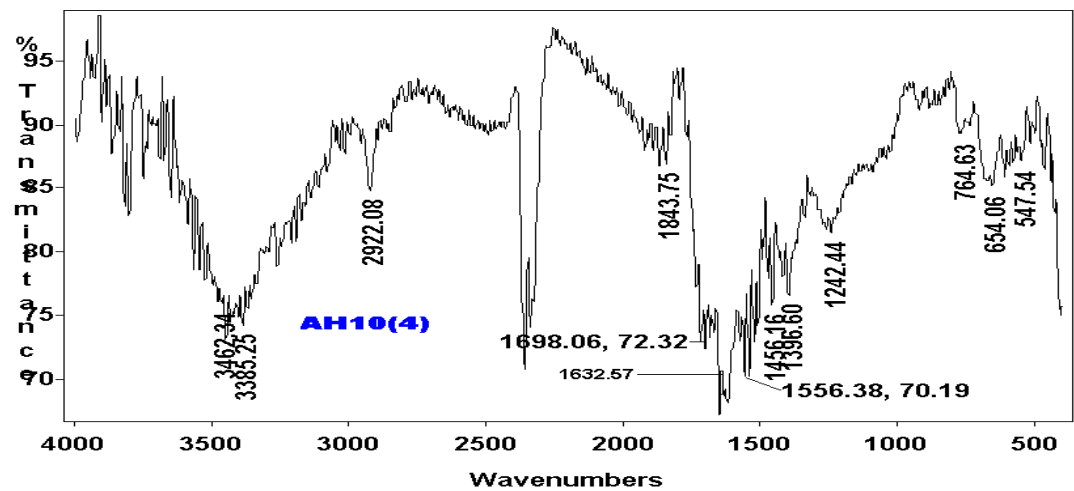
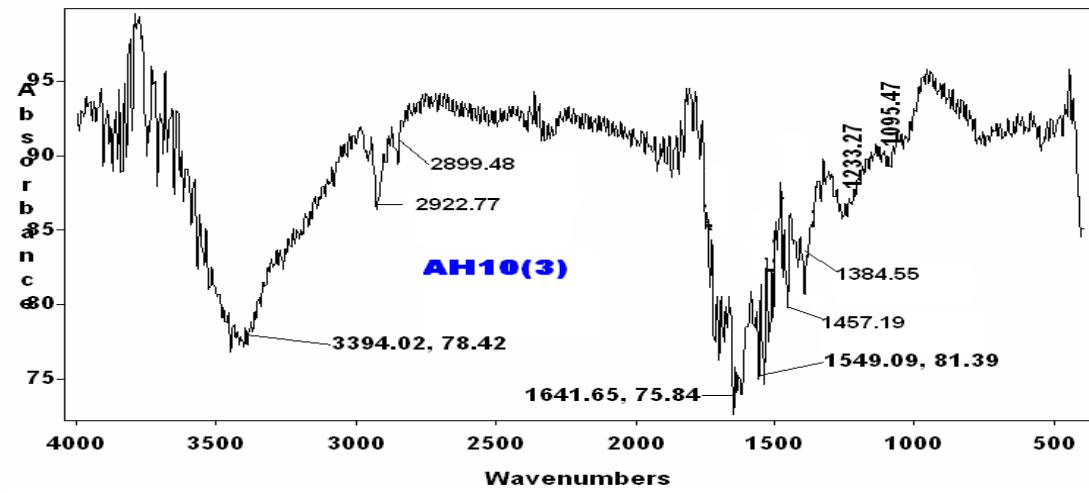
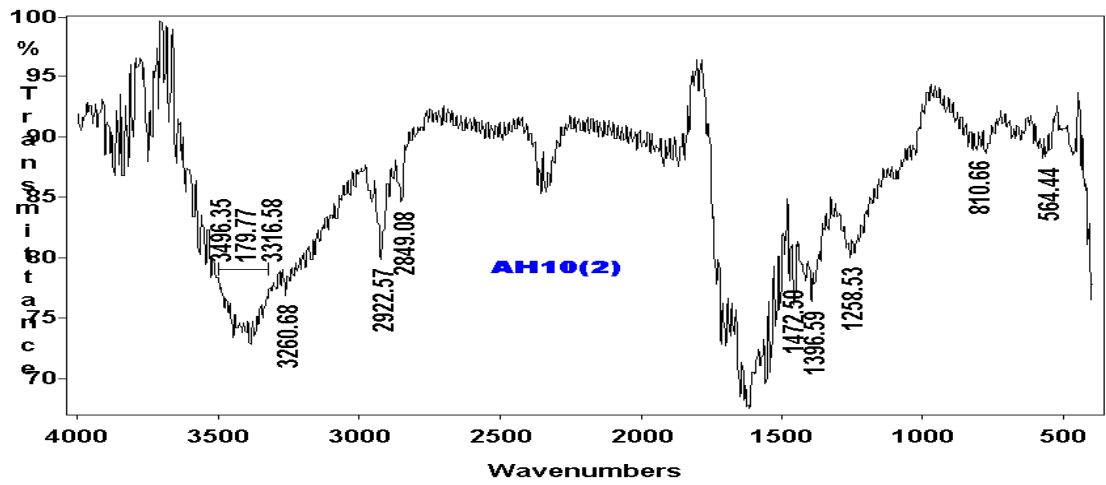


La figura 19 muestra los espectros infrarrojos para los diferentes compuestos AH<sub>10</sub> obtenidos en la cinética de reacción. En general, todos los espectros evidencian bandas en posiciones muy similares, pero algunas diferencias en su intensidad (%T), disminuyendo entre los compuestos AH<sub>10(1)</sub> y AH<sub>10(2)</sub>, aumentando entre los compuestos AH<sub>10(2)</sub> y AH<sub>10(3)</sub>, finalmente disminuyendo entre los compuestos AH<sub>10(3)</sub> y AH<sub>10(4)</sub>. Todas las bandas pueden ser asignadas a:

**Figura 19. Espectros IR de los compuestos AH<sub>10(1,2,3,4)</sub>**







Los cuatro espectros presentan bandas integradas en las regiones:

3528 – 3303  $\text{cm}^{-1}$ . Banda fuerte correspondiente posiblemente a una tensión de grupos OH alcohólicos con enlace probablemente de hidrógeno intermolecular de un sistema polimérico. También puede aparecer en esta región el N-H libre asociados por enlaces de hidrógeno, la cual generalmente se solapa con la tensión de los OH.

2946 - 2922  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas de intensidad débil. Tensión asimétrica de C-H saturado, mostrando clara evidencia de estructuras alifáticas como  $\text{CH}_2$  y  $\text{CH}_3$ .

2869 - 2849  $\text{cm}^{-1}$ . Vibración simétrica de C-H saturado de estructuras alifáticas  $\text{CH}_2$ , donde las bandas presentan una intensidad débil. Y en el compuesto  $\text{AH}_{10(4)}$  no aparece o posiblemente en muy débil su intensidad.

1726 – 1698  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles correspondientes a la tensión C=O en bandas de 1730 - 1710  $\text{cm}^{-1}$  para sistema monomérico y 1700 - 1680  $\text{cm}^{-1}$  para sistema dímero y 1725 - 1700  $\text{cm}^{-1}$  para alifáticos saturados.

1632 – 1618  $\text{cm}^{-1}$ . Tensión C=C de sistema aromático conjugado en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados. Bandas de intensidad débil.

1565 – 1520  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles que corresponden a las vibraciones del anillo en compuestos aromáticos orto – sustituidos (41).

1457 – 1456  $\text{cm}^{-1}$ . Las bandas débiles son atribuidas a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos.

1408 – 1384  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles que detectan la presencia de grupos metilo correspondiente a una flexión simétrica.

1259 – 1242  $\text{cm}^{-1}$ . Bandas débiles. Vibraciones de C-C de cadenas alifáticas o estiramiento de C-O, deformación de OH y COOH y estiramiento de aril éteres.

Al comparar los diferentes espectros infrarrojos obtenidos de los compuestos de la hidrólisis básica y ácida, se encontró que las bandas aparecen en posiciones muy similares y sus cambios se dan en la intensidad (%T), que esta directamente relacionado con el contenido o la proporción de los diferentes grupos funcionales en la estructura de estos compuestos.

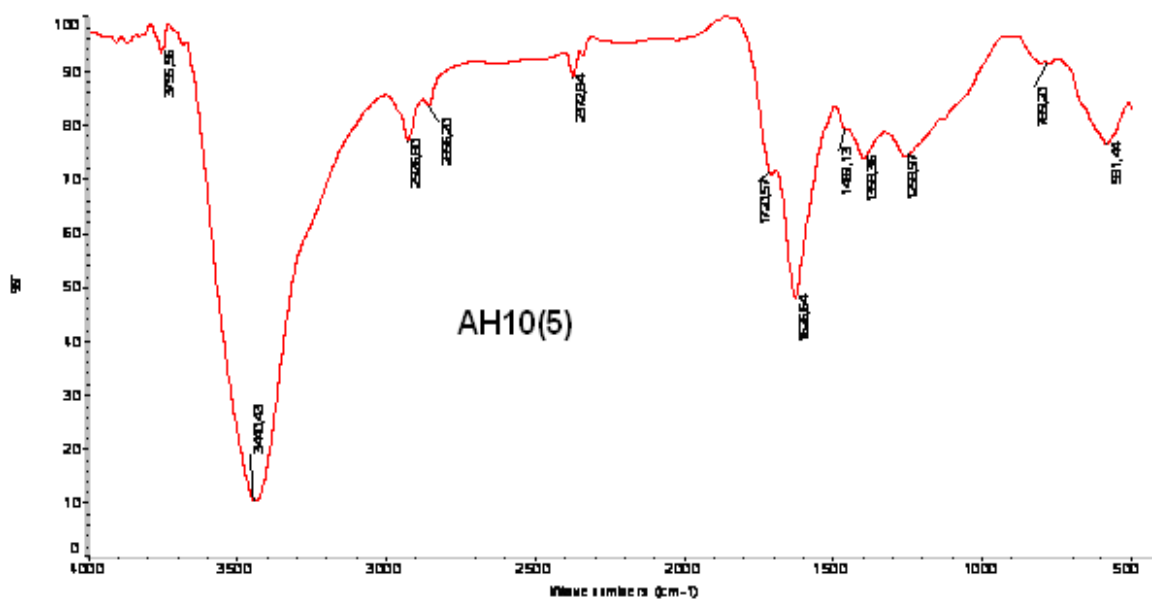
Al igual que en la hidrólisis básica, en la hidrólisis ácida se hidrolizaron 50mg de ácidos húmicos, obteniéndose diferencias en el valor de la relación E4/E6 del compuesto AH<sub>10(5)</sub> respecto al compuesto AH<sub>10(4)</sub> (ver tabla 15). Y todos los compuestos fueron insolubles en agua y HCl al 10% y solubles en NaOH al 10%.

**Tabla 15. Relación E4/E6 del compuesto AH<sub>10(5)</sub>**

Compuesto	Relación E4/E6
AH <sub>10(5)</sub>	4.03

En la figura 20 se muestra el espectro IR del compuesto AH<sub>10(5)</sub>, el cual presenta bandas muy similares al compuesto AH<sub>10(4)</sub>, con la diferencia que la banda a 2856 cm<sup>-1</sup> si se evidencia, las bandas son un poco más definidas y la intensidad (%T menor) es mayor, indicando una mayor concentración de los diferentes grupos funcionales en el compuesto AH<sub>10(5)</sub>. Todas las bandas mostradas en el espectro pueden ser asignadas a: 3440.43 cm<sup>-1</sup>(vibración O-H), 2926 – 2856 cm<sup>-1</sup> (grupos alifáticos C-H), 1720 cm<sup>-1</sup> (Vibración C=O), 1626 cm<sup>-1</sup> ( grupos C=C), 1459 cm<sup>-1</sup> (deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos), 1398 cm<sup>-1</sup> (grupos metilo correspondiente a una flexión simétrica) y 1258 cm<sup>-1</sup> (Vibraciones de C-C de cadenas alifáticas o estiramiento de C-O, deformación de OH y COOH y estiramiento de aril éteres). Además al igual que en el espectro del compuesto AH<sub>6(5)</sub>, en el compuesto AH<sub>10(5)</sub> no se observa la banda cercana a 1074 cm<sup>-1</sup>, asignada a impurezas de Si-O.

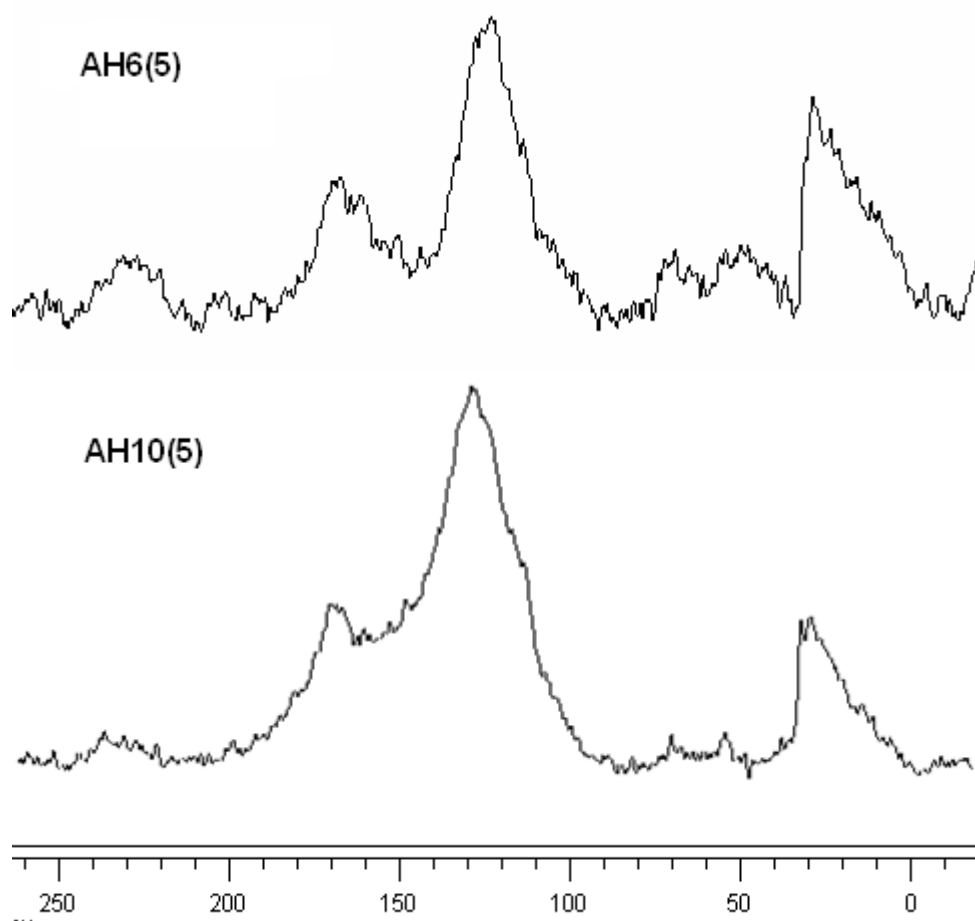
Figura 20. Espectro IR del compuesto AH<sub>10(5)</sub>



Una técnica moderna para la caracterización de las sustancias húmicas (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) es la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de <sup>13</sup>C (42, 43). Ofreciendo una descripción genérica del tipo de carbón que contienen los grupos en una muestra y su contribución significativa a la información concerniente a la naturaleza química de las sustancias húmicas (44).

La figura 21 contiene los espectros de <sup>13</sup>C RMN para los compuestos AH<sub>6(5)</sub> y AH<sub>10(5)</sub>. Las bandas fueron identificadas e integradas a: 20 – 40 ppm de mediana intensidad, la segunda banda entre 50 – 60 ppm, la tercera entre 70 – 80 ppm, la cuarta, banda ancha, entre 120 – 140 ppm y la quinta entre 170 – 190 ppm, las cuales corresponden respectivamente a carbonos alifáticos o parafínicos, grupos metoxi, grupos –CH<sub>2</sub>O, grupos aromáticos y grupos carboxílicos o grupos fenólicos. Y una banda nueva a 190 – 220 ppm, correspondiente a los grupos carbonilo (21). Donde el compuesto AH<sub>10(5)</sub> presenta bandas de menor intensidad en la mayoría de las regiones, excepto en la región 120 -140ppm, respecto al compuesto AH<sub>6(5)</sub>.

**Figura 21. Espectros  $^{13}\text{C}$  RMN de los compuestos  $\text{AH}_{6(5)}$  y  $\text{AH}_{10(5)}$**



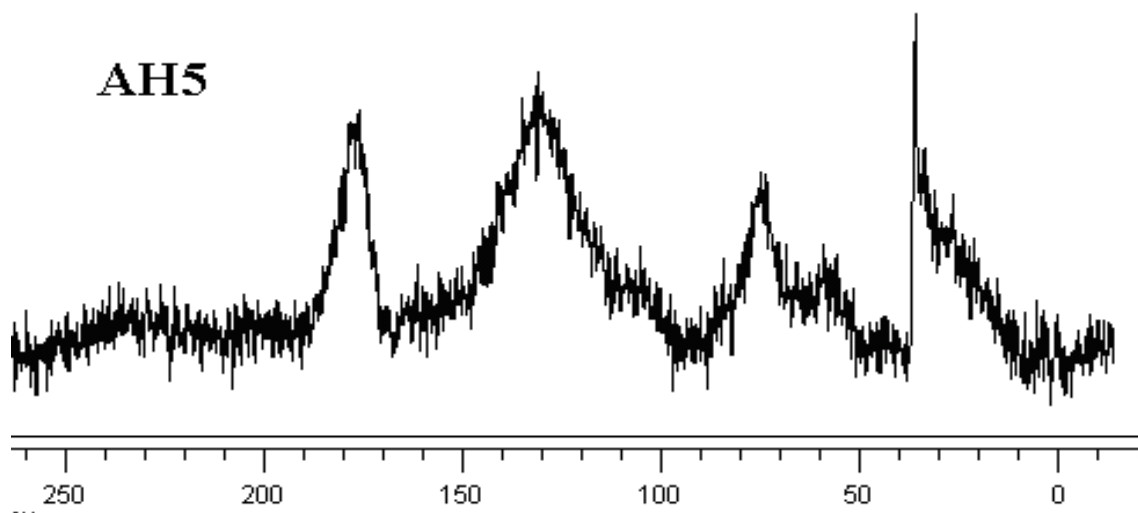
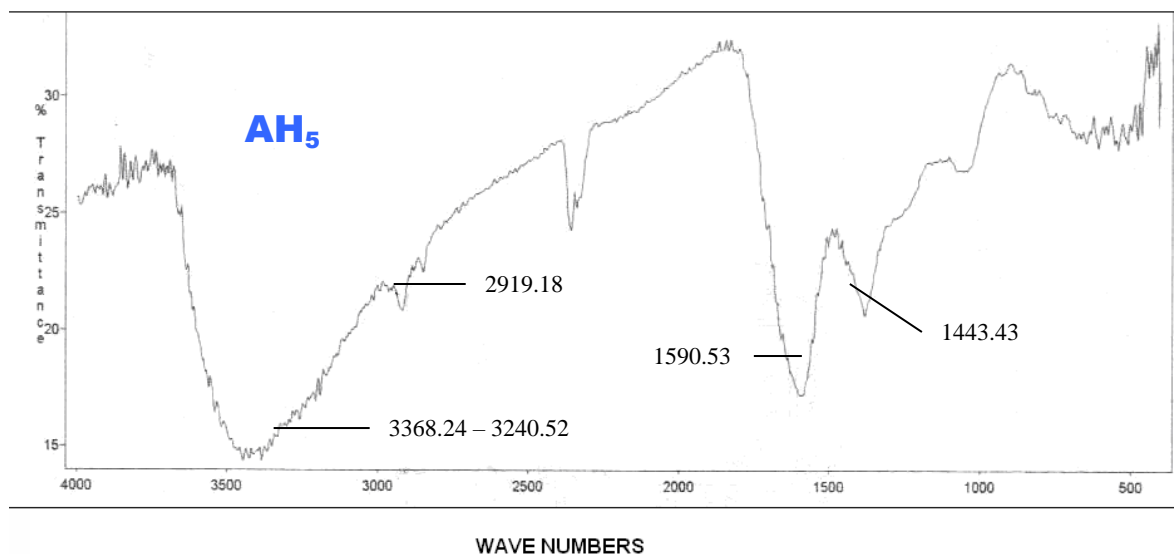
La transferencia en el grado de magnetización entre protones y carbonos, depende del número de protones enlazados al núcleo del átomo de carbono, como del tipo de ambiente, por ejemplo la presencia de grupos funcionales, la espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  RMN no es cuantitativa. Sin embargo desde la eficiencia CP para grupos con desplazamientos químicos similares, es posible comparar la relativa distribución de los grupos funcionales entre las muestras. En la tabla N° 16 se muestra dicha distribución para los dos compuestos anteriormente mencionados y el compuesto  $\text{AH}_5$ , que corresponde al producto obtenido del tratamiento de los AH con etanol absoluto.

Dicho compuesto no presenta una modificación considerable en su estructura, respecto al compuesto AH, solo se observa un leve incremento de las estructuras alifáticas (relación E4/E6 de 4.81), y los espectros IR y  $^{13}\text{C}$  RMN son muy similares (figura 22), considerando de este modo el mantenimiento de un cuerpo estructural y así la posibilidad de comparación con el resto de compuestos.

**Tabla 16. Distribución relativa de la intensidad del carbono para los compuestos AH<sub>6(5)</sub>, AH<sub>10(5)</sub> y AH<sub>5</sub> proveniente de los espectro de  $^{13}\text{C}$  RMN**

Pico		Desplazamiento ppm	Distribución de intensidad		
			AH <sub>6(5)</sub>	AH <sub>10(5)</sub>	AH <sub>5</sub>
C=O de cetona, quinona, aldehído		231.9	19.1	17.1	0.0
COO <sup>-</sup> , COOH de carboxil, éster, quinona		171.2	100	100	100
Fenólico	C-O-, C-OH	153.4	46.6	25.9	19.6
Aromático	CH,C	130	337.2	238.6	207.1
Aromático	CH	112.2	34.2.	11.7	27.5
Sacárido, alcohol, éter	OH, CH <sub>2</sub> OH, CH	74.8	9.3	2.5	52.3
Metoxi, metino, C cuaternario	CH <sub>3</sub> O-, CH-NH, CH, C.	56.2	6.9	5.0	33.7
Metileno en alifáticos simples	CH <sub>2</sub>	34.5	22.5	4.6	9.4
Metileno en alifáticos simples	CH <sub>2</sub>	31.6	42.2	19.7	27.6
Metil	CH <sub>3</sub>	24.5	27.4	51.2	42.9
Metil	CH <sub>3</sub>	15.3	4.0	15.2	16.8

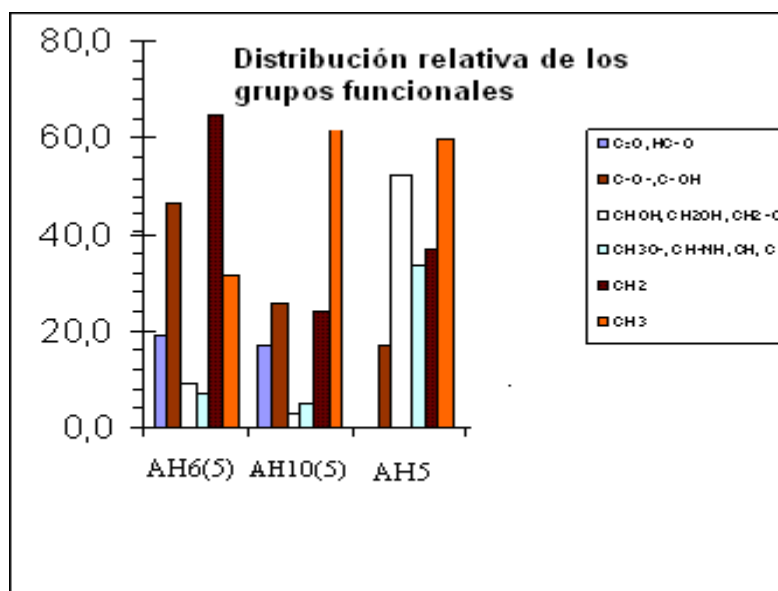
Figura 22. Espectros IR y  $^{13}\text{C}$  RMN del compuesto AH<sub>5</sub>



Respecto a la distribución relativa de la intensidad (tabla 16), se observa que todas las muestras presentan una intensidad significativa en el rango de desplazamiento químico 162 – 190 ppm, correspondiente a carbonos del tipo carboxil, éster y quinona. Por lo cual se le asignó a este rango una intensidad de 100 para todas las muestras.

El compuesto AH<sub>6(5)</sub> presenta mayores intensidades en los picos correspondientes a los grupos fenólicos (153.4 ppm), aromático (130 ppm) y metileno en alifático simples (34.5 ppm); mientras que el compuesto AH<sub>10</sub> tiene intensidades mayores en: metil (24.5 ppm) y el compuesto AH<sub>5</sub> en: sacárido, alcohol, éter (74.8 ppm) y metoxi, metino, carbón cuaternario (56.2 ppm). La figura 23 muestra esquemáticamente los diferentes cambios en las intensidades de los compuestos obtenidos en la hidrólisis básica, ácida y tratamiento con etanol, consignados en la tabla 16.

**Figura 23. Representación esquemática de la intensidad de las bandas en los espectros <sup>13</sup>C RMN para los compuestos AH<sub>6(5)</sub>, AH<sub>10(5)</sub> y AH<sub>5</sub>**



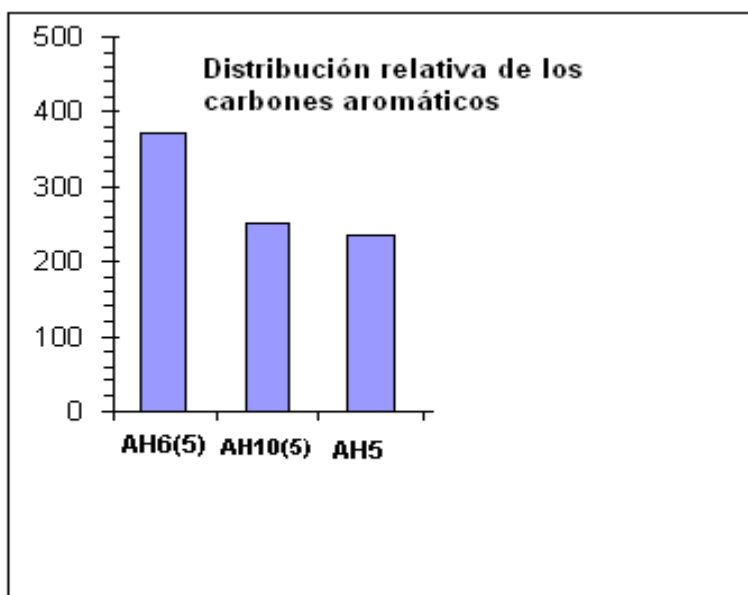
El producto principal de la hidrólisis básica, de acuerdo a la distribución de la intensidad, genera moléculas de cetona, quinona, aldehído y aumenta la cantidad del carbón en las estructuras aromáticas (disminución en el valor de la relación E4/E6), metileno en alifáticos simples, y la presencia de grupos fenólicos respecto al compuesto AH<sub>5</sub>, cuya estructura es muy similar al compuesto AH. Además se observa una disminución en las intensidades de los grupos sacáridos, alcohol, éter, metil y metoxi, indicando posiblemente reacciones de transformaciones de grupos funcionales, como los fenoles, los cuales participan activamente en la polimerización. Además se dedujo que a pesar de los diferentes cambios estructurales con aumentos y disminución en las cantidades de determinados grupos funcionales y formas del carbón, existen estructuras que se mantienen como parte del cuerpo estructural de los ácidos húmicos.



El producto principal obtenido de la hidrólisis ácida, experimentó un aumento en la intensidad respecto a moléculas de cetona, quinona, aldehído, estructuras alifáticas ( $\text{CH}_3$  a 24.5 ppm) y grupos fenólicos, respecto al compuesto  $\text{AH}_5$ . Igualmente se observa una disminución en las intensidades de los grupos sacáridos, alcohol, éter, metil y metoxi. Respecto a las estructuras aromáticas hay un aumento en la intensidad a 130 ppm, pero una disminución a 112.2 ppm, que al compararlo con la relativa distribución del carbón aromático de los otros dos compuestos, su relación E4/E6 no concuerda, debido a que es mayor el carbón aromático en el compuesto  $\text{AH}_{6(5)}$ . Esta diferencia se debe posiblemente a que en la hidrólisis ácida se logra un rompimiento mayor de los diferentes enlaces con presencia de grupos éster, que mantienen unidas a determinadas moléculas que conforman los ácidos húmicos, obteniéndose una molécula o moléculas de menor tamaño, respecto al compuesto  $\text{AH}_{6(5)}$  y por ende una relación E4/E6 menor, pero una molécula o moléculas más condensadas que el compuesto  $\text{AH}_5$ .

La figura 24 muestra la intensidad relativa del carbón aromático para los compuestos  $\text{AH}_{6(5)}$ ,  $\text{AH}_{10(5)}$  y  $\text{AH}_5$ .

**Figura 24. Intensidad relativa de los compuestos  $\text{AH}_{6(5)}$ ,  $\text{AH}_{10(5)}$  y  $\text{AH}_5$**



De acuerdo a toda la información obtenida mediante el empleo de las diferentes técnicas espectroscópicas como: ultravioleta-visible, infrarroja y resonancia magnética nuclear, y a las investigaciones realizadas por Cheftz et al, 2002 y Kang et al, 2003, se plantea que en la estructura de los ácidos húmicos existe posiblemente un cuerpo estructural conformado por anillos aromáticos, quinonas, grupos fenólicos, grupos alcohólicos, sacáridos y cadenas alifáticas, donde los grupos fenólicos y posiblemente el metoxi juegan un rol importante en la polimerización y condensación de los ácidos húmicos (biogenética de las biomacromoléculas) (4, 45).

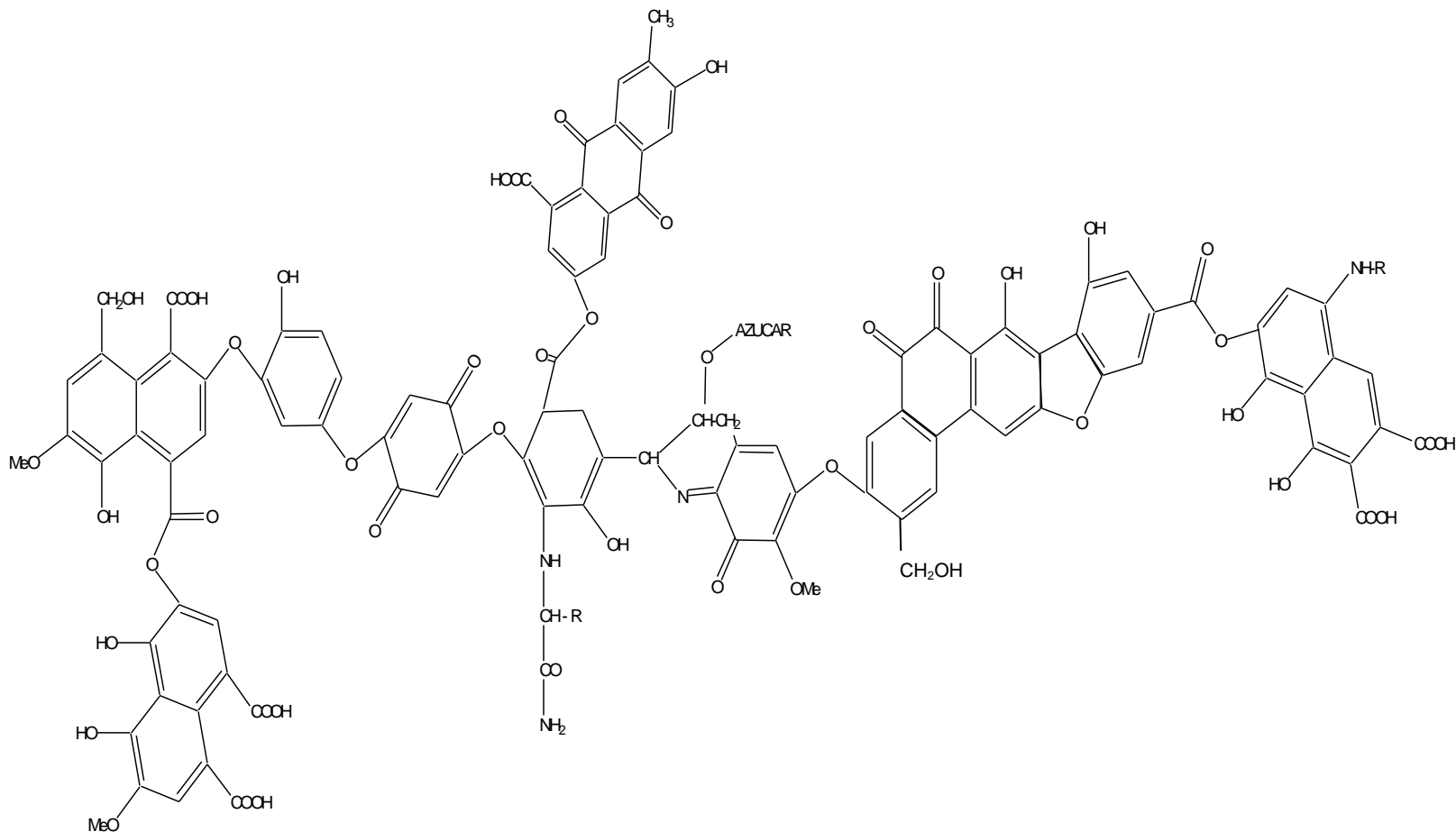
Las diferencias entre los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN para los compuestos  $\text{AH}_{6(5)}$ ,  $\text{AH}_{10(5)}$  y  $\text{AH}_{10}$  como: los cambios de intensidad en las bandas integradas para las cinco regiones, la aparición de la nueva banda en los espectros de los compuestos  $\text{AH}_{6(5)}$  y  $\text{AH}_{10(5)}$  y los diferentes valores en el porcentaje de distribución de intensidad, permitió plantear la siguiente estructura para los ácidos húmicos "jóvenes" (figura 25); consistente, principalmente, con la estructura planteada por Stevenson (4).

La estructura, conforme a la química de los anillos aromáticos y sus sustituyentes, principalmente el  $-\text{OH}$  por ser un fuerte activador orto y para respecto a otros sustituyentes (27), presenta un cuerpo estructural conformado por anillos aromáticos,  $-\text{OH}$  fenólicos, grupos carboxílicos, grupos metoxi, grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , quinonas, sacáridos, aminoácidos, enlaces éter, éster, etc., y unas estructuras aromáticas secundarias simples y moderadamente complejas enlazadas al cuerpo estructural mediante enlaces tipo éster.

A diferencia de la estructura planteada por Stevenson, en esta investigación se evidencio la presencia de grupos metoxi,  $-\text{CH}_2\text{OH}$  y posiblemente enlaces tipo éster, los cuales sufren sustitución nucleofílica característica de los derivados de ácidos carboxílicos. El ataque ocurre en el carbono carbonílico deficiente en electrones, y da como resultado el reemplazo del grupo  $\text{OR}'$  (27).

Estas diferencias pueden atribuirse posiblemente a la madurez de los ácidos húmicos obtenidos.

Figura 25. Estructura hipotética para los ácidos húmicos “jóvenes”



## 6. CONCLUSIONES

- El suelo presentó una acidez muy fuerte, baja cantidad de bases de cambio, lo cual se debe a pérdidas por lixiviación y una alta cantidad de materia orgánica que incrementa la humedad, la capacidad de intercambio catiónico y la retención del aluminio, el cual es bajo pero con una saturación mayor que las bases de cambio.
- El método granulométrico es adecuado para la obtención de la materia orgánica humificada por el rendimiento obtenido (63.21%) y porque produce el mínimo de desnaturalización de las estructuras de las sustancias húmicas.
- La materia orgánica humificada presentó un porcentaje de carbón orgánico mayor respecto al del suelo, indicando la presencia de las sustancias húmicas (ácidos fúlvicos, ácidos húmicos y huminas) y otros compuestos orgánicos como proteínas, azúcares, aminoácidos ligados a estas sustancias.
- La relación E4/E6 y la presencia de grupos metoxi de los ácidos húmicos (4.64) indicó que hay más carbón haciendo parte de las estructuras alifáticas que de las estructuras altamente conjugadas. Y que corresponde a un ácido húmico que hace parte de un humus joven.
- De acuerdo al espectro IR de los ácidos húmicos los grupos funcionales que hacen parte de estas sustancias son: OH alcohólicos, NH, C=C aromáticos, C-O y OH fenólico y CH alifático. Y las impurezas debida a silicatos es muy poca, por la intensidad de las bandas en el espectro.
- La acetilación permitió observar diferencias considerables en la estructura y comportamiento químico de los ácidos húmicos, obteniéndose una mejor resolución y bandas nuevas en los espectros infrarrojos y de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$ .

- En la hidrólisis básica y ácida se obtuvieron tres y dos compuestos, respectivamente, encontrándose que la relación E4/E6 depende del tiempo de reacción, lo que indica la generación de diferentes tipos de moléculas, y de la cantidad de muestra empleada en dichas reacciones, evidenciando la heterogeneidad de los ácidos húmicos.
- La presencia de bandas muy similares en los diferentes espectros infrarrojos y de resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$ , pero con distintas intensidades, permiten considerar la existencia de un cuerpo estructural conformado por anillos aromáticos, quinonas, grupos fenólicos, grupos alcohólicos, sacáridos y cadenas alifáticas, donde los grupos fenólicos y posiblemente metoxi juegan un rol importante en la polimerización y condensación de los ácidos húmicos.
- De acuerdo a los espectros  $^{13}\text{C}$  RMN los ácidos húmicos presentaron cinco bandas reiterativas correspondientes a: carbonos alifáticos, grupos metoxi, grupos  $-\text{CH}_2\text{OH}$ , grupos aromáticos, grupos fenólicos y carboxílicos.
- La espectroscopía de  $^{13}\text{C}$  RMN junto con la infrarroja permiten la elucidación parcial de la estructura de moléculas complejas como los ácidos húmicos.
- Con base en las estructuras presentadas por Stevenson y otros autores, se logra identificar un cuerpo estructural y complementar con grupos de moléculas no presentes en estas estructuras y una estructura para este tipo de ácidos húmicos que corresponden o hacen parte de un humus joven.
- Finalmente se concluye que este trabajo aporta importantes elementos en la elucidación parcial de la estructura de los ácidos húmicos en suelos colombianos y por ende aporta científicamente al desarrollo de la ciencia del suelo.

## BIBLIOGRAFÍA

- (1) FASSBENDER, Hans. BOMERNISZA, E. 1987. Química de los suelos en énfasis en suelos de América Latina. Costa Rica. p. 7, 11 y 121-124.
- (2) MUÑOZ, Bertha. 2004. Extracción y caracterización preliminar de huminas de un suelo Andisol del Departamento del Cauca. Popayán. Trabajo de grado (químico). Universidad del Cauca. p. 24-26.
- (3) FASSBENDER, Hans. BOMERNISZA, E. 1987. Química de los suelos en énfasis en suelos de América Latina. Costa Rica. p. 45-54
- (4) STEVENSON, F. 1985. Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. A Wiley – Interscience publication. p. 1-42.
- (5) ZAPATA, Raúl. 2001 ¿Qué es el humus? **Revista uso de microorganismos en la agricultura materia orgánica: mito o realidad**. X congreso de la ciencia del suelo. p. 155-159.
- (6) RUIZ, Orlando. 2002. Sustancias húmicas e índices de humificación. Universidad Nacional de Colombia. Medellín.
- (7) Edafología. Ciencias Ambientales. Propiedades del suelo. Propiedades fisicoquímicas. Intercambio iónico. Available from Internet. [www.unex.e/edafo/ECAL5ScoHumification.htm](http://www.unex.e/edafo/ECAL5ScoHumification.htm). Actualizada 28 de febrero de 2004.
- (8) AYHAN, Demirbas. 2003. Characterization of humic substance from lignite samples. **Energy sources**. p. 23-32.
- (9) MALAGON, D. LLINAS, R. CHAMARRO, C. 1995. Suelos de Colombia origen, evolución, clasificación, distribución y uso. Santa fé de Bogotá: IGAC. p. 310-311.

- (10) ANDREUX, Francis. 2005. Función de la materia orgánica sobre los aspectos bioquímicos del suelo: formación y consecuencias de los enlaces entre grupos amino y ciclos aromáticos. Encuentro nacional de la ciencia del suelo "Materiales orgánicos y microorganismos en la agricultura Colombiana". Sociedad Colombiana de la Ciencia del Suelo.
- (11) BURDON, J. 2001. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? **Soil Science**. Vol 166. N° 11. USA. p. 752-769.
- (12) MacCARTHY, Patrick. 2001. The principles of humic substances. **Soil Science**. Vol 166. N° 11. USA. p. 738-751.
- (13) ALMENDROS, G et al. 1998. Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and <sup>13</sup>C-NMR of successive residues. **Soil Biol Biochem**. Vol 30. N° 6. p. 755-765.
- (14) JINDONG, Mao et al. 2002. Suitability of different <sup>13</sup>C solid-state NMR techniques in the characterization of humic acids. **Inter J. Environ. Anal chem**. Vol 82 N° 4. p. 183-196.
- (15) KOKONOVA, M.M. 1966. Soil organic matter. Pergamon Press, Oxford. p. 400-404.
- (16) STEVENSON, F.J. 1982. Humus chemistry: genesis, composition reactions. John Wiley. New York
- (17) CHEN, Y. SENESI, N, and SCHNITZER, M. 1977. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. **Soil Sci Am J**. Vol 41. p. 352-358.
- (18) SILVERSTEIN, R.M. BASSLER, G.C. 1968. spectrometric identification of organic compounds. 2<sup>da</sup> Edition. John Wiley & Sons, inc. EUA. p. 64 – 109.
- (19) RIBEIRO, Josanaide et al. 2001. FTIR tentative characterization of humic acids extracted from organic materials. **Spectroscopy Letters**. Vol 34. N° 2. p. 179-190.

(20) Espectroscopía de resonancia magnética nuclear. <http://www.sinorg.uji.es/htm>.

(21) Kang, S. AMARASIRIWARDENA, D. VENEMAN P. XING B. 2003. Characterization of ten sequentially extracted humic acids and humin from a soil in western Massachusetts. **Soil Science**. Vol 168. Nº 12. p. 880-886

(22) HOLDRIDGE, Lesli R. 1987. Ecología basada en zonas de vida. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. San José de Costa Rica. p. 1-26.

(23) BRAVO, Isabel. GIRALDO, Efrén. 2003. Manual de prácticas de química agrícola: análisis de suelos. Universidad del Cauca. p. 9-77.

(24) Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. 1990. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi". 5<sup>ta</sup> edición. Subdivisión de Agrología. p. 148-175.

(25) DAVILA, Janeth. 2002. Caracterización preliminar de ácidos fúlvicos de dos suelos colombianos. Popayán Trabajo de grado (Químico). Universidad del Cauca. p. 12-40.

(26) ALMENDROS, G. DORADO, J. 1999. Molecular characteristics related to the biodegradability of humic acid preparations. **European Journal of soil science** 50. p. 227-236.

(27) MORRISON, R.T. BOYD, R.N. 1987. Química orgánica. 5<sup>ta</sup> edición. Addison – Wesley Iberoamericana. EUA. p. 64, 109, 490-500 y 860.

(28) SANCHEZ, Monedero, M.A. CEGARRA, Roig. BERNAL, M.P, PAREDES, C. 2002. Effects of HCL-HF purification treatment on chemical composition and structure of humic acids. **European Journal of soil science**. 53. p. 375-381.

(29) DORMAAR, J.F. METCHE, M. JACQUIN, F. 1970. Extraction and purification of humic acids from a redzina Ah and podzol Bh horizon. **Soil Biology and Biochemistry** 2. p. 285-293.



- (30) DE SERRA, M.O. SCHNITZER, M. 1972. Extraction of humic acid by álcali and chelating resin. **Canadian Journal of Soil Science** 52. p. 365-374.
- (31) PICCOLO, A. 1988. Characteristics of soil humic extracts obtained by some organic and inorganic solvents and purified by HCl-HF treatment. **Soil Science** 146. p. 418-426.
- (32) DAI, K.H. JOHSON, C.E. 1999. Aplicability of solid-state  $^{13}\text{C}$  CP/MAS NMR analysis in Spodosols: chemical removal of magnetic materials. **Geoderma** 93.p. 289-310.
- (33) SWIFT, R.S. 1996. Organic matter characterization. In : Methods of soil analysis: part 3, chemical methods (ed D.L Sparks). **Soil Science Society of America**, Madison, WI. p. 1011-1069.
- (34) LEINWEBWE, P. BLUMENSTEIN, O. SCHULTEN, H.R. 1996. Organic matter composition in sewage far soils: Investigations by  $^{13}\text{C}$ -NMR and pyrolysis fiel ionization mass spectroscopy. **Eupopen Journal Soil Science**. 47.p. 71-80.
- (35) CHEN, Z. PAWLUK, S. 1995. Structural variations of humic acids in two soils of Alberta mollisols. **Geoderma**. 65.p. 173-193.
- (36) NIEMEYER, J. CHEN, J. BOLLAG, J.M. 1992. Characterization of humic acids compost, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. **Soil Science. Am. J.** 56.p.135-140.
- (37) COOK, R.L. LANGFORD, C.H. 1996. A modified cross-polarization magic angle spinning  $^{13}\text{C}$  NMR procedure of the study of humic materials. **Anal Chem.** 68.p. 3979-3986.
- (38) PRESTON, C.M.1996. Aplications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. **Soil Sci.** N° 161.p.144-166.
- (39) CHEFETZ, B. TARCHITZKY, J. ASHISH P. HATCHER , P.G. CHEN, Y. 2002. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. **Soil Sci Soc Am J.** Vol 66.p. 129-140.

(40) BAES, A.U. BLOOM, P.R. 1989. Difuse reflectance and transmission Fourier transform infrared spectroscopy of humic and fulvic acids. **Soil. Sci. Soc Am J.** Vol 53.p. 695-700

(41) BELLAMY, L.J. 1975. The infrared spectra of complex molecules. Chapman and Hall, London.

(42) WILSON, M.A. 1987. NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry. **Pergamon Press**, Oxford U.K.

(43) MAO, J.D. HU, W.G. SCHMIDT, R.G. GHABBOUR, E.A. XING B. 2000. Quantitative characterization of humic substances by solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance. **Soil Science** N° 64. p. 873-884.

(44) CHEFETZ, B. SALLOUM, M,J. DESHMUKH, A.P. HATCHER, P,G. 2002. structural components of humic acids as determined by chemical modifications and carbon-13 NMR, pyrolysis and tremechemolysis-gas chromatography/Mass spectrometry. **Soil science society America journal.** 66,4.p. 1159 – 1171.

(45) BU`LOCK, J.D. 1969. Biosíntesis de productos naturales. Ediciones Urmo. España. p. 13 – 56.