

**DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE  $\text{Cu}^{2+}$  EN UN SUELO ANDISOL  
DEL CAUCA Y EVALUACIÓN DEL  $\text{Cu}^{2+}$  UNIDO A LA  
FRACCIÓN DE ÁCIDOS FÚLVICOS**

**MARICELA SOLARTE ORDÓÑEZ**

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

**DETERMINACIÓN VOLTAMPEROMÉTRICA DE  $\text{Cu}^{2+}$  EN UN SUELO ANDISOL  
DEL CAUCA Y EVALUACIÓN DEL  $\text{Cu}^{2+}$  UNIDO A LA  
FRACCIÓN DE ÁCIDOS FÚLVICOS**

**MARICELA SOLARTE ORDÓÑEZ**

**Trabajo de grado presentado como requisito parcial para optar  
al título de Químico**

**Director**

**M. Sc. ISABEL BRAVO REALPE**

**Asesor**

**M. Sc GERMAN CUERVO OCHOA**

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

Nota de aceptación:

---

---

---

---

---

---

---

Firma del presidente jurado

---

Firma del jurado

---

Firma del jurado

Popayán, 5 de mayo de 2006

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
<b>RESUMEN</b>	1
<b>1 OBJETIVOS</b>	2
<b>1.1 General</b>	2
<b>1.2 Específicos</b>	2
<b>2 MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE</b>	3
<b>2.1 Los cationes del suelo</b>	3
2.1.1 <i>El cobre en el suelo</i>	4
<b>2.2 Fraccionamiento del Cobre</b>	5
<b>2.3 Características de las sustancias húmicas</b>	6
2.3.1 <i>Caracterización de las sustancias húmicas</i>	7
2.3.2 <i>Reacciones de iones metálicos con sustancias húmicas</i>	9
<b>2.4 Interacción de metales con ácidos fúlvicos</b>	11
<b>2.5 Voltamperometría</b>	13
2.5.1 <i>Polarografía</i>	13
2.5.1.1 Electroodos	14
2.5.1.2 Técnicas polarográficas según el potencial aplicado	15
2.5.2 <i>Voltamperometría de redisolución</i>	17
<b>2.6 Características de suelo andisol</b>	18
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS</b>	21
<b>3.1 Ubicación geográfica</b>	21
<b>3.2 Equipos utilizados</b>	21
<b>3.3 Análisis físicos y químicos del suelo</b>	22
3.3.1 <i>Análisis físicos</i>	22
3.3.2 <i>Análisis químicos</i>	23
<b>3.4 Separación de la materia orgánica fresca (M.O.F) y la materia orgánica humificada (M.O.H)</b>	25
3.4.1 <i>Método granulométrico</i>	25
3.4.2 <i>Método densimétrico</i>	27
<b>3.5 Extracción y separación de las sustancias húmicas</b>	28
3.5.1 <i>Extracción de huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos</i>	28
3.5.2 <i>Separación de los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos</i>	30
3.5.3 <i>Purificación de los ácidos fúlvicos</i>	32
3.5.3.1 Eliminación de sales de la fracción fúlvica	32
3.5.4 <i>Caracterización de los ácidos fúlvicos</i>	33
3.5.4.1 Determinación de la acidez total	33
3.5.4.2 Fraccionamiento de los ácidos fúlvicos mediante filtración a través de sephadex G-75	34
3.5.4.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible. Relación de densidades ópticas entre 465 y 665 nm. (Relación E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> )	34

<b>3.6</b>	<b>Estandarización de la técnica voltamperométrica para</b>	<b>35</b>
	<b>determinación de Cu<sup>2+</sup></b>	
<b>3.7</b>	<b>Parámetros estadísticos para la estandarización de la técnica</b>	<b>36</b>
	<b>voltamperométrica para la determinación de Cu<sup>2+</sup></b>	
<b>3.8</b>	<b>Extracción de Cu<sup>2+</sup> en la muestra de suelo</b>	<b>36</b>
3.8.1	<i>Extracción de Cu<sup>2+</sup> total</i>	37
3.8.2	<i>Extracción de Cu<sup>2+</sup> unido a la materia orgánica</i>	37
3.8.3	<i>Extracción de Cu<sup>2+</sup> disponible</i>	38
3.8.4	<i>Extracción de Cu<sup>2+</sup> intercambiable</i>	39
<b>3.9</b>	<b>Deteminación de Cu<sup>2+</sup> en los ácidos fúlvicos</b>	<b>39</b>
3.9.1	<i>Determinación de Cu<sup>2+</sup> en las fracciones obtenidas por la separación</i>	<i>40</i>
	<i>sobre sephadex G-75</i>	
<b>4</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Análisis físicos y químicos</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Separación de la materia orgánica humificada (M.O.H) de</b>	<b>43</b>
	<b>la materia orgánica fresca (M.O.F)</b>	
<b>4.3</b>	<b>Extracción y separación de las sustancias húmicas</b>	<b>44</b>
4.3.1	<i>Purificación de los ácidos fúlvicos</i>	44
4.3.2	<i>Caracterización de los ácidos fúlvicos</i>	45
4.3.2.1	<i>Acidez total de los ácidos fúlvicos</i>	45
4.3.2.2	<i>Fraccionamiento de los ácidos fúlvicos sobre sephadex G-75</i>	47
4.3.2.3	<i>Espectroscopía Ultravioleta-Visible. Relación de densidades ópticas</i>	<i>49</i>
	<i>entre 465 y 665nm. (Relación E<sub>4</sub>/E<sub>6</sub>)</i>	
<b>4.4</b>	<b>Resultados de la estandarización de la técnica de</b>	<b>50</b>
	<b>voltamperometría para determinar Cu<sup>2+</sup></b>	
4.4.1	<i>Electrolito soporte</i>	50
4.4.2	<i>Condiciones experimentales</i>	51
4.4.3	<i>Método de cuantificación</i>	53
4.4.4	<i>Parámetros estadísticos para la estandarización de la técnica</i>	<i>53</i>
	<i>voltamperométrica</i>	
<b>4.5</b>	<b>Determinación de Cu<sup>2+</sup> en las diferentes fracciones extraídas del</b>	<b>57</b>
	<b>suelo</b>	
4.5.1	<i>Determinación del Cu<sup>2+</sup> total</i>	57
4.5.2	<i>Determinación del Cu<sup>2+</sup> en la fracción orgánica</i>	59
4.5.3	<i>El cobre disponible</i>	61
4.5.4	<i>El cobre intercambiable</i>	62
4.5.5	<i>Determinación del Cu<sup>2+</sup> en la fracción de ácidos fúlvicos</i>	63
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>67</b>
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>72</b>
<b>7.1</b>	<b>Adición estándar</b>	<b>72</b>



## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> <i>Diagrama esquemático de reacciones de algunos agentes quelantes (Q) formados en los suelos provenientes de la materia orgánica con cationes metálicos (<math>M^{n+}</math>).</i>	3
<b>Figura 2.</b> <i>Principio de la cromatografía de exclusión por tamaño.</i>	9
<b>Figura 3.</b> <i>Estructura de un ácido fúlvico propuesta por Buffle, (Stevenson, 1985).</i>	11
<b>Figura 4.</b> <i>Interacción del <math>Cu^{2+}</math> tanto con grupos fenólicos y carboxílicos.</i>	12
<b>Figura 5.</b> <i>Interacción del <math>Cu^{2+}</math> con grupos carboxílicos.</i>	12
<b>Figura 6.</b> <i>Interacción del <math>Cu^{2+}</math> con estructuras cetónicas.</i>	12
<b>Figura 7.</b> <i>Celda polarográfica.</i>	14
<b>Figura 8.</b> <i>Sensibilidad en función de la técnica polarográfica.</i>	16
<b>Figura 9.</b> <i>Etapas de la voltamperometría de redisolución anódica.</i>	17
<b>Figura 10.</b> <i>Comparación de la técnica polarográfica y voltamperométrica.</i>	18
<b>Figura 11.</b> <i>Esquema de la separación granulométrica.</i>	26
<b>Figura 12.</b> <i>Esquema de la separación densimétrica.</i>	27
<b>Figura 13.</b> <i>Extracción de huminas, ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.</i>	28
<b>Figura 14.</b> <i>Separación de los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos.</i>	31
<b>Figura 15.</b> <i>Separación de los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos.</i>	32
<b>Figura 16.</b> <i>Determinación de la acidez total de los ácidos fúlvicos purificados.</i>	33
<b>Figura 17.</b> <i>Filtración de los ácidos fúlvicos purificados a través de sephadex G-75.</i>	34
<b>Figura 18.</b> <i>Determinación de la relación <math>E_4/E_6</math>.</i>	35
<b>Figura 19.</b> <i>Digestión del suelo para la determinación de <math>Cu^{2+}</math> total.</i>	37
<b>Figura 20.</b> <i>Extracción de <math>Cu^{2+}</math> unido a la fracción orgánica del suelo.</i>	38
<b>Figura 21.</b> <i>Extracción de <math>Cu^{2+}</math> disponible con DTPA.</i>	38

<b>Figura 22.</b> Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ intercambiable.	39
<b>Figura 23.</b> Determinación del $\text{Cu}^{2+}$ unido a la fracción de ácidos fúlvicos.	39
<b>Figura 24.</b> Curva de titulación de 5 mL de ácidos fúlvicos purificados con NaOH 0.0175N.	46
<b>Figura 25.</b> Primera derivada del pH con respecto al volumen promedio de NaOH agregado en la titulación de 5mL de ácidos fúlvicos purificados	47
<b>Figura 26.</b> Máxima absorción de los ácidos fúlvicos purificados en un rango de 200 a 700 nm.	48
<b>Figura 27.</b> Elución de los ácidos fúlvicos purificados a través de sephadex G-75.	49
<b>Figura 28.</b> Determinación de $\text{Cu}^{2+}$ con electrolito de fosfato.	51
<b>Figura 29.</b> Adiciones patrón de estándares de $\text{Cu}^{2+}$ en un rango de 0 a 0,25 ppm.	52
<b>Figura 30.</b> Curva de adición estándar en un rango de 0 a 0,05ppm para evaluar linealidad.	54
<b>Figura 31.</b> Curva de adición estándar para determinar el LD y LC del método utilizado.	56
<b>Figura 32.</b> Influencia de la relación suelo:mezcla digestora sobre el potencial de reconocimiento del $\text{Cu}^{2+}$ .	58
<b>Figura 33.</b> Potencial de reconocimiento del $\text{Cu}^{2+}$ con una relación suelo : mezcla digestora optima ( 1:100)	59
<b>Figura 34.</b> Voltamperograma del $\text{Cu}^{2+}$ perteneciente a la fracción orgánica.	60
<b>Figura 35.</b> Estructuras de complejos orgánicos.	61
<b>Figura 36.</b> Voltamperograma del $\text{Cu}^{2+}$ disponible en el suelo.	62
<b>Figura 37.</b> Distribución del $\text{Cu}^{2+}$ en las diferentes fracciones del suelo.	63
<b>Figura 38.</b> Voltamperograma de los ácidos fúlvicos purificados.	64
<b>Figura 39.</b> Estructura de un complejo $\text{Cu}^{2+}$ - ácido fúlvico a) Formación de anillos quelatos, b) Como enlaces de hidrógeno y c) Atracción electrostática debido a los grupos COOH.	65
<b>Figura 40.</b> Distribución del $\text{Cu}^{2+}$ en las fracciones de ácidos fúlvicos purificados.	66
<b>Figura 41.</b> Ejemplos de curvas de calibración para el método de adición estándar. En (a) La señal se representa en función del volumen de patrón añadido y en (b) En función de la concentración del patrón añadido tras su dilución.	73



## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
<b>Tabla 1</b>	15
Electrodos de trabajo en función del material y del tamaño.	
<b>Tabla 2</b>	15
Técnicas según electrodo de trabajo empleado.	
<b>Tabla 3</b>	35
Parámetros para la determinación de $\text{Cu}^{2+}$ por voltamperometría.	
<b>Tabla 4</b>	42
Propiedades físicas y químicas del suelo andisol del departamento del Cauca.	
<b>Tabla 5</b>	44
Resultados de la separación de la muestra de suelo después de una separación granulométrica.	
<b>Tabla 6</b>	45
Conductividad y pH de la F.F en el proceso de purificación.	
<b>Tabla 7</b>	50
Relación $E_4/E_6$ de los ácidos fúlvicos purificados y de las fracciones obtenidas por elución a través de sephadex G-75.	
<b>Tabla 8</b>	53
Parámetros óptimos para determinar $\text{Cu}^{2+}$ en suelo mediante voltamperometría de redisolución anódica.	
<b>Tabla 9</b>	55
Concentraciones estándar de $\text{Cu}^{2+}$ y sus respectivas desviaciones estándar en un rango de 0 a 0,005 ppm.	
<b>Tabla 10</b>	55
Reproducibilidad de las concentraciones de un estándar de $\text{Cu}^{2+}$ en un periodo de 15 días.	
<b>Tabla 11</b>	56
Concentraciones del estándar de $\text{Cu}^{2+}$ y sus respectivas corrientes en un rango de 0 a 0,05 ppm para calcular LD y LC.	
<b>Tabla 12</b>	57
Límite de detección y cuantificación para el $\text{Cu}^{2+}$ en las diferentes fracciones analizadas.	
<b>Tabla 13</b>	58
Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ en las diferentes fracciones analizadas	

## LISTA DE ACRÓNIMOS

A.F:	Ácido fúlvico
A.H:	Ácidos húmicos
C.I.C:	Capacidad de intercambio catiónico
DTPA:	Dietilen tetraamino pentacetato
E <sub>4</sub> /E <sub>6</sub> :	Relación de densidades ópticas entre 465 y 665 nm
EDTA:	Etilen diamino tetracetato
F.F:	Fracción fúlvica
LC:	Límite de cuantificación
LD:	Límite de detección
M.O:	Materia orgánica
M.O.F:	Materia orgánica fresca
M.O.H:	Materia orgánica humificada
M.O.L:	Materia orgánica libre
Redox:	Proceso de reducción/oxidación
RMN:	Resonancia magnética nuclear
RSD:	Desviación estándar relativa
S.H:	Sustancias húmicas
UV-Vis:	Ultravioleta visible

## RESUMEN

Se caracterizó física y químicamente una muestra de suelo Andisol proveniente de la vereda la Aurelia , municipio de Cajibío, departamento del Cauca con el fin de determinar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  en diferentes fracciones de la muestra de suelo mediante la técnica voltamperometría de redisolución anódica. Estas fracciones se obtuvieron aplicando métodos de extracción con: Acetato de amonio, Dietilen Tretaamino Pentaceato (DTPA), peróxido de hidrógeno y mezcla ácida de perclórico-nítrico con el objeto de evaluar el  $\text{Cu}^{2+}$  en su forma: Intercambiable, disponible, unido a la materia orgánica y además del contenido total de este micronutriente en el suelo.

Para evaluar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la fracción de ácidos fúlvicos, inicialmente se separó la materia orgánica humificada mediante método granulométrico. Posteriormente, se hizo la extracción alcalina secuencial de la materia orgánica humificada con tetraborato, pirofosfato e hidróxido de sodio, la separación de los ácidos fúlvicos en el sobrenadante de esta extracción, precipitando los ácidos húmicos en medio ácido y obteniendo los ácidos fúlvicos en solución. Para la purificación parcial de estos ácidos fúlvicos, se eliminaron las sales, mediante resinas de adsorción, intercambio y membranas de diálisis. Se realizó una caracterización de los ácidos fúlvicos mediante la relación  $E_4/E_6$ , acidez total y cromatografía de exclusión molecular a través de sephadex G-75.

Los resultados indicaron: Un 57% del  $\text{Cu}^{2+}$  total unido a la fracción orgánica, un 9% correspondiente al  $\text{Cu}^{2+}$  disponible y el  $\text{Cu}^{2+}$  intercambiable no fue detectado mediante la técnica empleada.

En la evaluación del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la fracción de ácidos fúlvicos se encontró que el 1% del  $\text{Cu}^{2+}$  total se encuentra unido a esta fracción , indicando un riesgo potencial para la contaminación ambiental.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 General

Determinar la cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$  unida a la fracción de ácido fúlvico y a las diferentes fracciones extraídas de un suelo andisol del Departamento del Cauca mediante voltamperometría de redisolución anódica.

### 1.2. Específicos

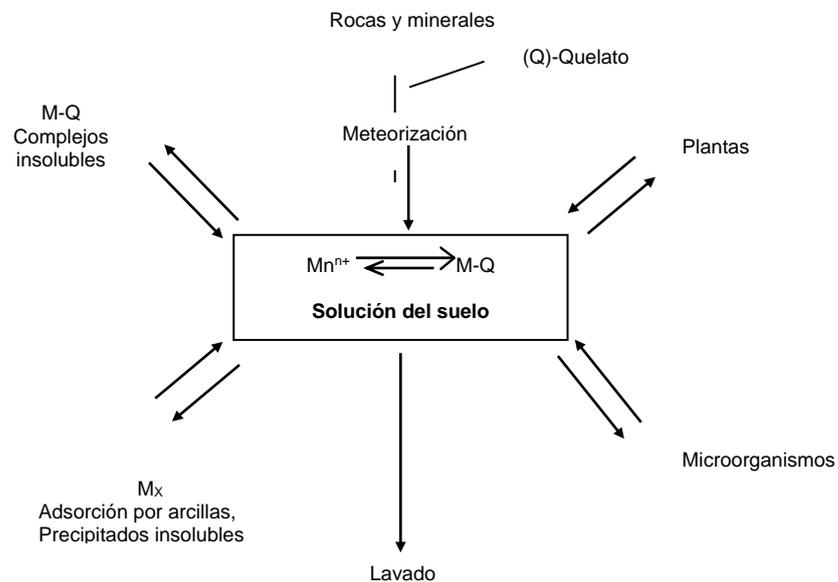
- Caracterizar física y químicamente el suelo a estudiar.
- Realizar la separación y purificación de ácidos fúlvicos mediante la extracción secuencial, previo fraccionamiento granulométrico y densimétrico de la materia orgánica humificada.
- Determinar las diferentes formas del micronutriente  $\text{Cu}^{2+}$  en el suelo mediante esquemas de fraccionamiento.
- Estandarizar la técnica voltamperométrica de redisolución anódica para la cuantificación de  $\text{Cu}^{2+}$  en suelos.
- Hacer un análisis del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la fracción de ácido fúlvico de la muestra de suelo andisol.

## 2. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1. Los cationes del suelo

En la figura 1, se indica un esquema de las distintas formas de los cationes metálicos y los procesos que tienen estos, en el suelo. Los cationes metálicos, una vez liberados de los minerales que los contienen, pueden permanecer en la solución del suelo, sólo si estos son complejados por la materia orgánica, sino, se precipitan como óxido y/o hidróxidos o sales. Igualmente, pueden ser retenidos por complejos de intercambio, inmovilizados por ácidos húmicos o fúlvicos. La presencia de los cationes metálicos en la solución del suelo y su predisposición a migrar está asociada a la presencia de ligandos aportados al suelo por la actividad de las raíces y de los microorganismos.

**Figura 1.** Diagrama esquemático de reacciones de algunos agentes quelantes (Q) formados en los suelos provenientes de la materia orgánica con cationes metálicos ( $M^{n+}$ ).



### 2.1.1 El cobre en el suelo

El ion  $\text{Cu}^{2+}$  puede encontrarse en diferentes formas en el suelo, **(McLean y Bledsoe, 1992)**:

- Disuelto en solución
- Ocupando sitios intercambiables sobre constituyentes inorgánicos del suelo
- Adsorbido específicamente sobre constituyentes inorgánicos
- Asociado con materia orgánica insoluble
- Precipitado como sólidos puros o mezclas
- presente en estructuras de minerales secundarios, y/o
- Presente en estructuras de minerales primarios.

El cobre disponible en el suelo es retenido principalmente como cation  $\text{Cu}^{2+}$  sobre superficies de minerales de arcilla o en asociaciones con la materia orgánica (M.O). La M.O y el pH del suelo son factores que influyen en la disponibilidad del cobre. La disponibilidad decrece con un incremento de la M.O del suelo, la cual enlaza cobre. Por consiguiente, los suelos orgánicos son más susceptibles a ser deficientes en  $\text{Cu}^{2+}$  que los suelos minerales. Por otro lado, el incremento del pH del suelo incrementa la cantidad de cobre unido a la M.O y arcillas, por lo tanto, decrece su disponibilidad.

El repetitivo uso de la mezcla  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O} + \text{Ca}(\text{OH})_2$ , como funguicida, el estiércol de cerdo, han conducido a casos de toxicidad por cobre, donde altos niveles reducen la germinación de semillas, el vigor de germinación, la producción de almidón, reduce la nodulación, la fijación de nitrógeno y la disponibilidad del hierro; en legumbres: Retarda la floración y maduración, y esteriliza el polen. **(Schulte y Kelling, 1999)**.

## 2.2 Fraccionamiento del Cobre

El suelo recibe elementos potencialmente tóxicos a través de procesos naturales y en mayor proporción a través de fuentes antropogénicas tales como: La minería, combustión de recursos fósiles, la metalurgia y a través de industrias químicas y electrónicas, **(Anderson y colaboradores, 1998)**.

Los suelos consisten en mezclas heterogéneas de sustancias orgánicas e inorgánicas y los mecanismos de enlace para los metales varían con la composición del suelo. Los efectos ecológicos de estos metales en suelos están relacionados estrechamente con la distribución de especies en la fase líquida y sólida del suelo, **(Lund y Fresenius, 1990)**. Dependiendo de su origen los metales existen en diferentes formas: Minerales y compuestos químicos; y en diferentes combinaciones con componentes minerales y orgánicos del suelo; los cuales pueden variar de acuerdo a las diferentes condiciones como: El pH, las condiciones redox, estados de oxidación, temperatura, la presencia de M.O y la actividad biológica, afectando así los niveles de concentración, movilidad, transformación y procesos de acumulación en el ecosistema. Todos estos factores influyen fuertemente en los ciclos biogeoquímicos de los elementos en su ambiente. En suelos ácidos existen cationes en su forma normal, complejos de cloruros y sulfatos, mientras que en suelos neutros o moderadamente alcalinos dominan los complejos de carbonatos, **(Kot y Namiesnik, 2000)**.

Para juzgar el impacto ambiental de los metales, se requiere de un comprensivo conocimiento de las interacciones entre estos y la matriz del suelo. El comportamiento de los elementos en el ambiente (biodisponibilidad, toxicidad y distribución) no puede ser determinado sobre la base de su concentración total, **(Petit y Rucandio, 1999)**.

Para evaluar la reactividad de las especies o formas de enlace de los metales como en el caso del micronutriente  $\text{Cu}^{2+}$  en materiales sólidos se han usado

algunos métodos de extracción tales como: Electrolitos ( $\text{CaCl}_2$  o  $\text{MgCl}_2$ ), soluciones amortiguadoras de ácidos débiles (ácido acético o ácido oxálico), agentes quelantes (EDTA o DTPA), agentes reductores ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), ácidos fuertes ( $\text{HCl}$ ,  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{HClO}_4$ ,  $\text{HF}$ ) o agentes básicos ( $\text{NaOH}$ ,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ), **(Lund y Fresenius, 1990)**. Las formas de enlace; conlleva a una determinación de la disponibilidad y movilidad de los metales para entender su comportamiento químico y su cinética.

### **2.3 Características de las sustancias húmicas**

Las sustancias húmicas (S.H), son macromoléculas heterogéneas derivadas de la degradación física, química y biológica de la materia orgánica. Estas sustancias se encuentran en suelos, sedimentos y en aguas naturales. Su importancia se debe a la capacidad de unir, movilizar metales y especies orgánicas antropogénicas.

Las S.H no pertenecen a una categoría de compuestos químicos y por lo tanto no pueden ser definidas en términos de características estructurales exactas, **(Hayes y colaboradores, 1989)**. La amplia gama de características de estas sustancias implica un alto grado de dispersión del peso molecular, (de 1.000 a 1'000.000 dalton) **(Schnitzer, 1978)**.

Puesto que las S.H son coloides amorfos, polidispersos, solamente es posible determinar un peso molecular promedio, que depende del método de medida aplicado. Las S.H muestran una capacidad de intercambio catiónico fuerte generalmente del 5 a 12  $\text{mmol g}^{-1}$ , debido a la presencia de grupos funcionales tales como ácidos carboxílicos y fenólicos.

Las S.H extraídas del suelo se distinguen de acuerdo a su solubilidad en medios acuosos en: Ácidos húmicos (A.H) insolubles a pH 2, ácidos fúlvicos (A.F) solubles en todos los intervalos de pH y la humina que son las sustancias insolubles a cualquier valor de pH.

### 2.3.1 Caracterización de las sustancias húmicas

La M.O del suelo es un todo heterogéneo donde la producción de formas estables de la misma es el resultado de una serie de reacciones de orden físico, químico y biológico de carácter complejo. La M.O estable del suelo está conformada, en general, por moléculas de alto peso molecular, como los ácidos húmicos (A.H), y moléculas de bajo peso molecular como los ácidos fúlvicos (A.F). La estructura molecular de las sustancias húmicas, se visualiza como bloques de compuestos aromáticos unidos básicamente por enlaces de hidrógeno, que contienen gran cantidad de grupos funcionales tales como: Carboxílicos, fenólicos, alcohólicos, enólicos, cetónicos e hidroxiquinonas, **(Osterberg y colaboradores, 1993)**.

Las sustancias orgánicas del suelo tienen una alta reactividad y propiedades fuertemente dependientes del pH del suelo, por cuanto constituyen una fuente de cargas variables de gran influencia, sobre la capacidad de intercambio catiónico; además poseen tamaño coloidal, mostrando una elevada superficie específica y una alta afinidad por el agua, **(Stevenson, 1982)**.

Por otra parte, estudiar la M.O del suelo implica obviar la fase inorgánica, por lo que un gran número de investigadores, **(Kononova y Belchikova, 1961)** han probado la bondad de diferentes sustancias extractantes; siendo las más usadas las bases fuertes y las sales neutras. Una vez extraída la M.O debe ser caracterizada; una forma de hacerlo es gracias a su absorción de radiación en el ultravioleta y el visible (UV-Vis) como consecuencia de la presencia de diferentes estructuras químicas en las S.H.

La absorción de radiación UV-Vis, por las S.H, está definida por: Grado de condensación de los anillos aromáticos presentes en las estructuras; relación entre el carbono contenido en estructuras aromáticas y alifáticas; contenido total de carbono y peso molecular **(Kasatochkin y colaboradores, 1964; Kononova, 1966 y Stevenson, 1982)**.

Entre los parámetros obtenidos mediante la absorción en el UV-Vis está la relación  $E_4/E_6$ , la cual permite inferir acerca del grado de aromaticidad de las moléculas de sustancias húmicas, así valores bajos, implican un alto grado de aromaticidad y valores altos indican un mayor contenido de cadenas alifáticas, **(Kononova, 1966)**. Además esta relación presenta una alta correlación con el contenido de radicales libres, O, C y -COOH presentes en la molécula, **(Baes y Blomm, 1990)**, y guarda una alta dependencia del pH, por cuanto éste define las estructuras químicas y la disociación de los grupos funcionales, **(Tsutsuki y Kuwatsuka, 1979)**.

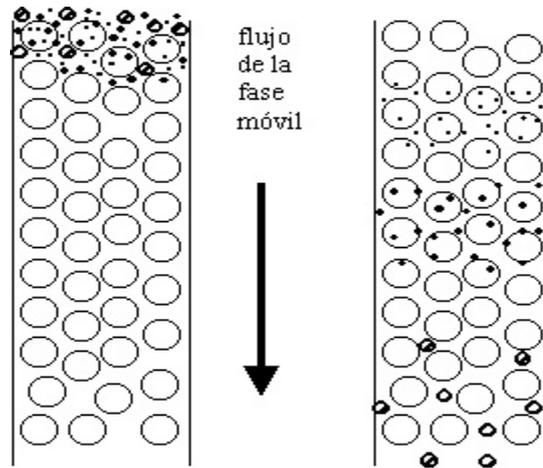
La acidez de los A.H y A.F provenientes del suelo es debida a la presencia de hidrógenos disociables de grupos ácidos carboxílicos aromáticos y alifáticos e hidróxilos alcohólicos y fenólicos. Los hidrógenos reactivos de esos grupos son los responsables de la capacidad de intercambio de la M.O. Uno de los métodos más utilizados actualmente para evaluar la presencia de estos grupos es realizar un desplazamiento de los hidrógenos con KCl y posterior titulación de estos con NaOH. Al graficar el volumen de NaOH agregado en función del pH es posible cuantificar este tipo de sustancias .

Las S.H son usualmente definidas como sustancias con alto peso molecular y alta heterogeneidad, por lo cual, su estructura hasta el momento no ha sido establecida. De esta manera, se han hecho estudios para tratar de tener fracciones homogéneas que ayuden a su dilucidación, **(Ouatmane y colaboradores, 2000)**. Mediante el estudio de la distribución del tamaño molecular el cual consiste en una columna de filtración molecular donde las partículas que forman la fase estacionaria están empaquetadas dentro de una columna cilíndrica por donde fluye la fase móvil (figura 2). Es frecuente que estas columnas estén en posición vertical y que la elución de la fase móvil sea impulsado por la fuerza de gravedad.

Las moléculas excluidas se mueven continuamente junto con el eluyente, en tanto que aquellas que por su tamaño pueden ingresar a la fase estacionaria son retardadas en función de sus tamaños. Por lo tanto, las primeras moléculas

que eluyen son las excluidas, y luego, en orden de tamaño decreciente, las moléculas no excluidas.

**Figura 2.** Principio de la cromatografía de exclusión por tamaño.



Además de las técnicas anteriormente expuestas existen otras tales como: Espectroscopia de infrarrojo, resonancia magnética nuclear, ultravioleta visible, pirólisis acoplado a masas, entre otras, las cuales en conjunto son herramientas poderosas para la identificación y elucidación de estructuras.

### 2.3.2 Reacciones de iones metálicos con sustancias húmicas

La importancia de la M.O radica en la gobernación de las reacciones de iones metálicos en suelo, la disponibilidad en plantas, (Formación de complejos metal-M.O) y su papel en la nutrición de las plantas y procesos pedogenéticos. La habilidad de la M.O para formar estos complejos estables con iones metálicos ha sido bien establecido, **(Stevenson, 1985)**.

Algunos metales que se encuentran naturalmente en el suelo o que son introducidos por agroquímicos, son retenidos como complejos insolubles volviéndose indisponible para las plantas. Por otro lado, muchos metales que ordinariamente se convertirían en precipitados insolubles, a valores de pH de

suelos agrícolas productivos comprendidos entre: 5,6 a 6,5, se mantienen en solución a través de la quelatación.

La formación de complejos metal-orgánicos en el suelo, tiene los siguientes efectos en suelos, sedimentos y aguas naturales:

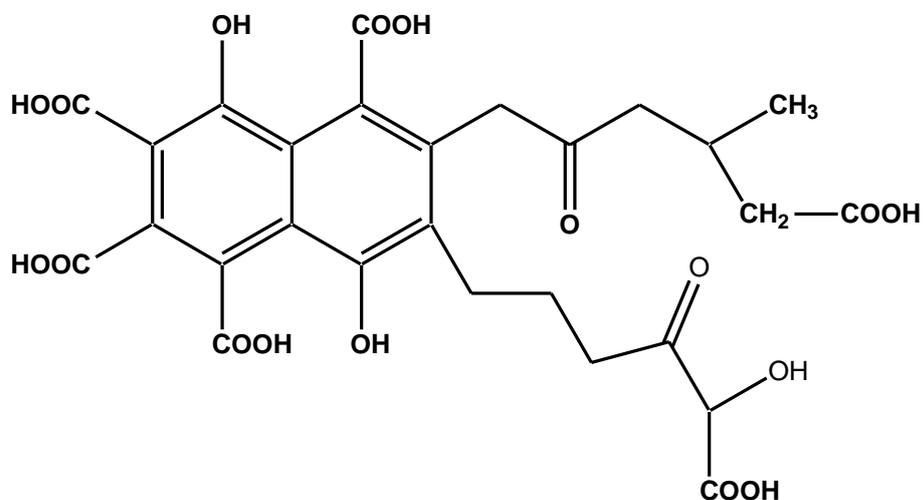
- Algunos iones metálicos que ordinariamente están en forma precipitada a los valores de pH comúnmente encontrados en los suelos, podrían ser mantenidos en forma soluble en la solución del suelo.
- La formación de estos complejos influye en la nutrición de las plantas, dejando en forma disponible cationes esenciales que a los valores de pH deberían estar precipitados y no disponibles.
- Bajo ciertas circunstancias la concentración de cationes tóxicos pueden ser llevados a formas complejas no tóxicas. Tal es el caso de la disminución de la toxicidad de  $Al^{+3}$  cuando es complejado por el suelo.
- La complejación juega un papel importante en la meteorización y formación de suelo. Los líquenes, bacterias y hongos con sus exudados inician el ataque a los minerales de las rocas a través de la formación de estas sustancias solubles, iniciándose así, la formación del suelo, **(Buol y colaboradores, 1981)**.
- La formación de complejos permite explicar la acumulación de cantidades tóxicas de cationes metálicos en depósitos orgánicos, como turberas y carbones de bajo rango, que si son luego utilizados con fines agrícolas pueden causar toxicidades.
- Se pueden formar bases de Lewis orgánicas con la aplicación de la materia orgánica al suelo, facilitando la complejación de elementos tóxicos y pueden llegar a los cuerpos de agua superficiales.

## 2.4 Interacción de metales con ácidos fúlvicos

Especial atención han tenido los A.F, los cuales se derivan de la descomposición de plantas y animales por su papel en el transporte y toxicidad de iones metálicos en suelos, aguas y como modificadores de la química de iones metálicos.

Como se observa en la figura 3, los A.F tienen una variedad de estructuras aromáticas y alifáticas con altos contenidos de grupos oxigenados particularmente ácidos carboxílicos e hidróxilos. Estos grupos pueden estar protonados y/o desprotonados en un rango de pH entre 3 y 9, habilitando al A.F a comportarse como un polielectrolito, **(Stevenson, 1985)**.

*Figura 3. Estructura de un ácido fúlvico propuesta por Buffle, (Stevenson, 1985).*

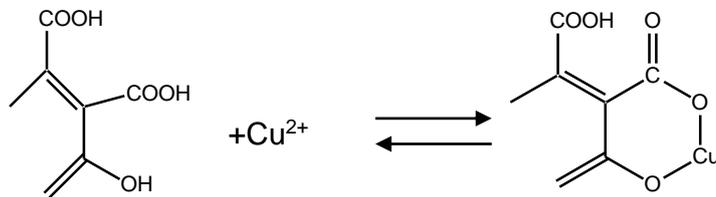


Los grupos oxigenados, particularmente carboxílicos y fenólicos se asocian a iones como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , y  $\text{Ni}^{2+}$ , entre otros. Mientras que los cationes monovalentes como  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  pueden formar enlaces electrostáticos con grupos aniónicos simples sobre el A.F, los iones metálicos divalentes pueden ser complejados en dos sitios aniónicos adyacentes,

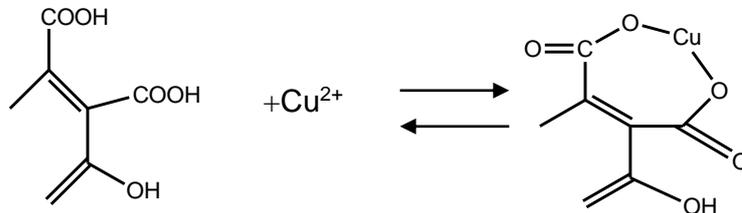
formando un anillo quelato. Esta asociación es generalmente más fuerte que la formada a través de un solo sitio.

Se han establecido dos tipos de reacciones involucradas en la interacción metal-A.F, (**Schnitzer, 1969 y Gamble y colaboradores, 1970**), una de las más importantes involucra tanto OH fenólicos como grupos COOH (Figura 4). Una reacción de menos importancia que envuelve grupos -COOH solamente se presenta en la figura 5.

**Figura 4.** Interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  tanto con grupos fenólicos y carboxílicos.

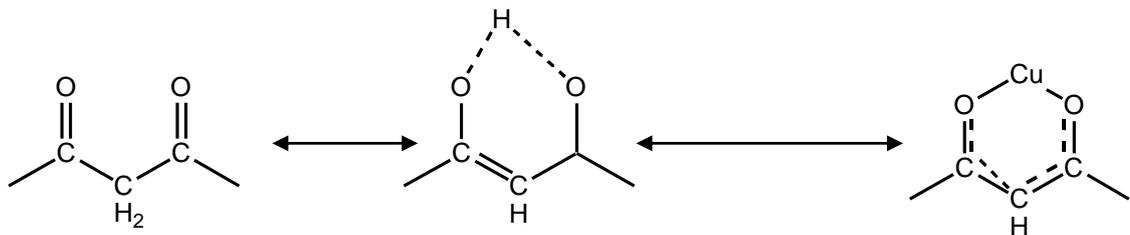


**Figura 5.** Interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  con grupos carboxílicos.



Los complejos también se pueden formar con estructuras cetónica conjugadas, de acuerdo a la figura 6.

**Figura 6.** Interacción del  $\text{Cu}^{2+}$  con estructuras cetónicas.



## 2.5 Voltamperometría

La característica común de todas las técnicas voltamperométricas implican el uso de un potencial (E) a un electrodo y la supervisión de la corriente que resulta (I) que atraviesa la celda electroquímica. En muchos casos el potencial aplicado se varía o la corriente se supervisa durante el tiempo (t). Así, todas las técnicas voltamperométricas se pueden describir como cierta función de E, I y de t.

Las ventajas analíticas de las técnicas voltamperométricas incluyen una alta sensibilidad, un rango de concentración lineal amplio para especies orgánicas e inorgánicas ( $10^{-12}$  a  $10^{-1}$ M), una gran cantidad de solventes y de electrolitos útiles, una amplia gama de temperaturas, análisis rápidos (segundos), determinación simultánea de varios analitos, la capacidad de determinar parámetros cinéticos y mecánicos. Los químicos analíticos utilizan rutinariamente las técnicas voltamperométricas para la determinación cuantitativa de una variedad de sustancias inorgánicas y orgánicas disueltas. Los químicos inorgánicos, físicos y biológicos utilizan extensamente estas técnicas para una variedad de propósitos, incluyendo estudios fundamentales de la oxidación y los procesos de la reducción en varios medios, los procesos de la adsorción en superficies, los mecanismos de la transferencia del electrón en una reacción, la cinética de los procesos de la transferencia del electrón, el transporte, la especificación y las características termodinámicas de una especie solvatada, **(Skoog y colaboradores, 2003)**.

### .2.5.1 Polarografía

Es una técnica donde el electrodo de trabajo es una gota de mercurio suspendida del extremo de un capilar de vidrio. El analito puede ser oxidado o reducido en la superficie de la gota de mercurio. La corriente circula en un electrodo auxiliar constituido por un alambre de platino, y como referencia se emplea un electrodo de calomel saturado o Ag/AgCl.

El potencial de la gota de mercurio se mide con respecto al electrodo de referencia, en el que circula una corriente despreciable. El potencial eléctrico (o voltaje) es variado de una manera regular entre dos electrodos (auxiliar o indicador y el de trabajo) mientras que la corriente es monitorizada. La forma del polarograma depende del método de análisis seleccionado, el tipo de electrodo auxiliar y la rampa de potencial que es aplicado. La respuesta de la corriente vs. potencial del experimento polarográfico tiene la típica forma sigmoideal, **(Skoog y colaboradores, 2003)**.

Lo que hace diferente la polarografía de otra medida voltamperométrica de barrido lineal es el modo de operación del electrodo de gota de mercurio, por ejemplo **DME** y **SMDE**. Las técnicas polarográficas más sensibles tienen un límite de detección próximo a  $10^{-9}$  M y precisión cercana al 5%.

#### 2.5.1.1 Electrodo

En polarografía se trabaja con tres electrodos como se ilustra en la figura 7.

*Figura 7. Celda polarográfica.*



- Electrodo de trabajo (**WE**). Se tienen distintos tipos, en función del material y el tamaño (tabla 1).
- Electrodo de referencia (**RE**). Ag/AgCl, KCl 3.0 M.

- Electrodo auxiliar (**AE**). Pt - Carbono Vitrificado.

**Tabla 1.** Electrodo de trabajo en función del material y del tamaño.

Material	Hg	DME, SMDE, HMDE	
	SÓLIDOS	Au, Pt, Ag, pasta de carbono, grafito, carbono vitrificado, químicamente modificados	
Tamaño	MACROELECTRODOS		
	MICROELECTRODOS		

Las distintas técnicas polarográficas que se utilizan se caracterizan por la forma de aplicar el potencial al electrodo de trabajo y por el material utilizado en su construcción, (Tabla 2), (Riley y Watson, 1987).

**Tabla 2.** Técnicas según electrodo de trabajo empleado.

<b>Polarografía</b>	Siempre que el electrodo de trabajo sea de mercurio y además trabaje en condiciones dinámicas ( <b>DME</b> y <b>SMDE</b> )
<b>Voltamperometría</b>	Cuando el electrodo de trabajo es sólido o si es de mercurio, la superficie de trabajo permanece constante a lo largo de todo el proceso REDOX ( <b>HMDE</b> )

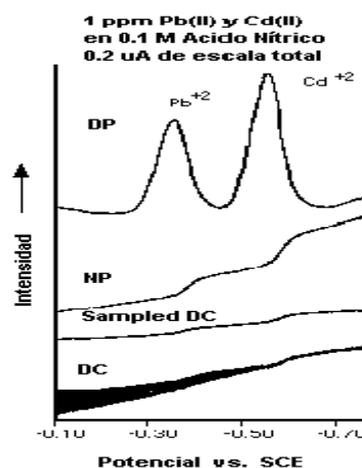
#### 2.5.1.2 Técnicas polarográficas según el potencial aplicado

- Polarografía de corriente directa (**DC**). Esta técnica consiste en aplicar un barrido lineal de potencial a velocidades bajas, menores a 10 mV/s a un electrodo de gota de mercurio, obteniéndose un polarograma característico del sistema analizado. El límite de sensibilidad está en  $10^{-5}$  M debido a la corriente residual.

- Polarografía de pulsos normales (**NP**). En ésta técnica cada pulso de potencial comienza al mismo nivel (no existe intensidad faradaica); es decir, el potencial se mantiene constante entre los pulsos y la amplitud entre éstos aumenta en pequeños intervalos en forma de una rampa lineal. El límite de detección es de  $10^{-7}$  M.
- Polarografía diferencial de pulsos (**DP**). Es una técnica que aplica sobre una rampa lineal del potencial incrementos fijos de potencial. La intensidad de corriente registrada es la diferencia entre la intensidad al final del pulso y la intensidad antes de aplicar el siguiente pulso. La técnica DP discrimina muy bien la intensidad capacitiva, llegando a niveles de detección de  $10^{-8}$  a  $10^{-9}$  M.
- Polarografía de onda cuadrada (**sw**). Es una técnica que ofrece la ventaja de una gran velocidad y una elevada sensibilidad. Con un electrodo de gota de mercurio, el barrido se lleva a cabo durante los últimos milisegundos de la vida de una única gota, cuando la intensidad de la corriente de carga es esencialmente constante

Como se puede observar en la figura 8, el método diferencial de pulsos (DP) presenta mayor sensibilidad, comparado con la polarografía de corriente directa (DC) y de pulsos normales (NP), (**Ruiz. y Pedrero, 1994**).

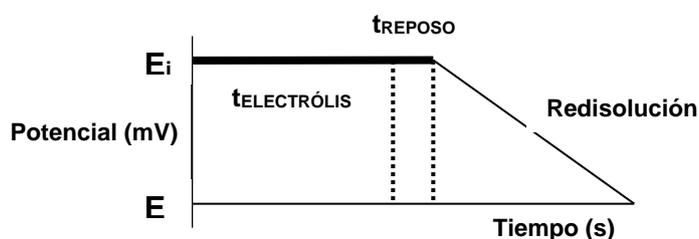
**Figura 8.** Sensibilidad en función de la técnica polarográfica.



### 2.5.2 Voltamperometría de redisolución

Durante una preelectrólisis a un adecuado potencial aplicado los iones metálicos son reducidos y amalgamados en un electrodo de trabajo, ya sea un sólido como el electrodo de disco rotatorio de oro ó de carbono y en muchos casos, un electrodo de gota de mercurio suspendida (HMDE), donde la superficie de trabajo permanece constante a lo largo de todo el proceso REDOX, **(Skoog y colaboradores, 2003)**. En la figura 9 se presentan las tres etapas de esta técnica analítica.

**Figura 9.** Etapas de la voltamperometría de redisolución anódica.

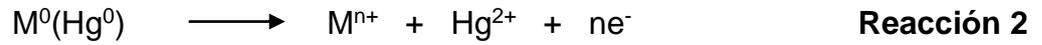


Por aplicación de un potencial constante más negativo que el potencial de media onda del analito, éste último se reduce y se disuelve en la gota suspendida. Puesto que solo se deposita una fracción del analito contenido en la solución, la reducción debe efectuarse durante un tiempo y una agitación reproducible.



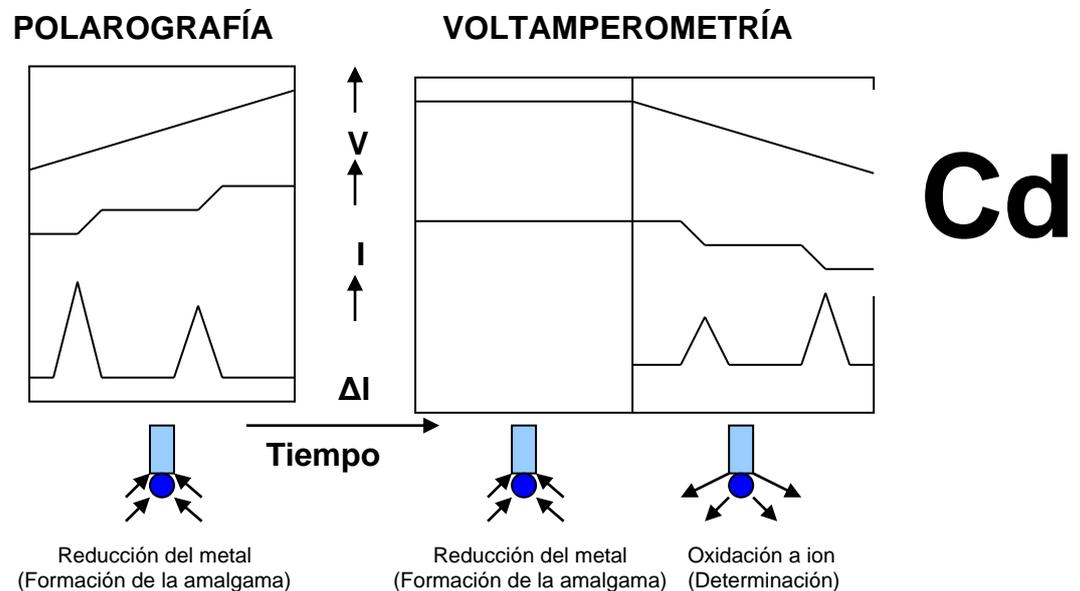
Después de haber concentrado el analito en la gota durante cierto tiempo, se suspende la agitación y el potencial se incrementa a velocidad constante para reoxidar el analito contenido en la gota. Durante esta oxidación, la corriente alcanza un valor máximo que es proporcional a la cantidad de analito que se ha

depositado. Para cada análisis se genera una nueva gota de mercurio, (Riley y Watson, 1987).



En la figura 10 se compara el mecanismo utilizado en polarografía y en voltamperometría.

Figura 10. Comparación de la técnica polarográfica y voltamperométrica.



## 2.6 Características del suelo andisol del departamento del Cauca

Se tomó una muestra compuesta de un suelo del departamento del Cauca, Municipio de Cajibío, vereda la Aurelia. Esta zona se caracteriza por sus cultivos de café y caña de azúcar razón por la cual se escogió como sitio de muestreo ya que se utilizan algunos fungicidas cúpricos para el control de la roya y de otros cultivos de pan coger.

Algunos de los estudios realizados en este tipo de suelo se han dirigido hacia el estudio de las sustancias húmicas. Davila, 2002, realizó algunos estudios en la

caracterización preliminar de ácidos fúlvicos extraídos de estos suelos, encontrando mediante espectroscopía de infrarrojo, bandas características de grupos COOH y OH fenólicos; otros estudios en cuanto: La retención de aluminio por dos fuentes de materia orgánica y su correlación con el grado de humificación, **(Muñoz G, 2003)**, extracción de huminas **(Muñoz B, 2004)** y el análisis de aluminio retenido por sustancias húmicas que actualmente está en ejecución.

Este suelo ha sido caracterizado como suelo ándico el cual está 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.

Los suelos de ando, referidos como suelos oscuros por los japoneses, fueron introducidos a la nomenclatura pedológica por Thorp y Smith en 1949 como suelos desarrollados a partir de una amplia gama de depósitos de cenizas volcánicas en las islas japonesas, en Filipinas, Hawai y casi con certeza en otras islas del pacífico, África y América central. Estos suelos fundamentalmente de espesor, estructura grumosa y granular fina, con un contenido de materiales orgánicos hasta del 30 % en los miembros más oscuros del grupo.

Las propiedades ándicas resultan principalmente de la presencia de cantidades significativas de complejos aluminio-humus de alofana, imoglobita y ferrihidridita. Los materiales amorfos se forman durante intemperismo y otros maretales parentales con contenidos significativos de vidrio volcánico. Las propiedades ándicas se definen en base a los porcentajes de hierro y aluminio extraídos con oxalato de amonio, la densidad aparente y la capacidad de retener fosfatos.

El pH es fuertemente tamponado entre 4 y 5 debido a la alta cantidad de aluminio precipitado, su alta capacidad de intercambio catiónico y la alta capacidad para fijar fosfatos y nitratos debido a su carga aniónica.

El horizonte A es de color negro (melánico), de consistencia friable, con muy baja densidad aparente, y tiene alta capacidad de retención de agua, alto índice de plasticidad (tixopría) alta superficie específica, reportándose valores de 400 m/g. En andisoles más evolucionados, la proporción de arenas es baja y generalmente corresponden a vidrios no, o poco alterados. Estos suelos presentan estructura granular en agregados finos del tamaño de los limos, denominados seudolimos.

Los andisoles son ricos en materia orgánica humificada la cual es en su mayor parte extractable con reactivos alcalinos corrientes. Los compuestos extractables A.F y A.H provienen de la insolubilización de precursores solubles, **(Dávila, 2002).**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación geográfica

Se tomó una muestra compuesta de un suelo de la vereda la Aurelia, municipio de Cajibío, departamento del Cauca, de acuerdo a metodología estandarizada en el Laboratorio de Agroquímica, Universidad del Cauca, **(Bravo y Giraldo, 2003)**.

Posición geomorfológica: Planicie disectada, meseta de Popayán

Temperatura promedio: 19 °C

Altura sobre el nivel del mar: 1740 m

Clima: Templado

Precipitación lluviosa anual: 1500 mm

#### 3.2. Equipos utilizados

- Balanza analítica PRECISA XT 220A (220 g/0.001 g)
- Planchas CORNING PC-420
- Espectrofotómetro visible SPECTRONIC GENESYS 20
- Equipo de digestión BÜCHI B-426 y destilación BÜCHI K-314
- Titulador automático universal METROHM E-70
- pH – metro METROHM E-744 con electrodo combinado de vidrio
- Tamizador automático AS200

- Polarógrafo analizador de trazas 746 VA – STAND 747 VA METROHM, el cual trabaja con los siguientes electrodos: Electrodo Multimodo de Mercurio (MME), Electrodo de Referencia Ag/AgCl/KCl 3.0 mol/L y Electrodo Auxiliar de Platino (Pt)

### **3.3 Análisis físicos y químicos del suelo**

Con el objeto de caracterizar el suelo se utilizaron las siguientes metodologías las cuales fueron previamente estandarizadas en el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca, **(Bravo y Giraldo, 2003)**, realizándose por duplicado.

#### *3.3.1 Análisis físicos*

- Humedad. Se determinó mediante método gravimétrico, para lo cual se pesó el suelo en una cápsula tarada previamente y se introdujo en estufa por 24 horas a 105 °C hasta peso constante. La diferencia de pesos determina la humedad del suelo.
- Textura. Se utilizó el método de Bouyoucos, basado en la Ley de Stokes, que 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.

Se midió la densidad de la muestra en agua, con un hidrómetro a diferentes tiempos: la primera se tomó a los 40 segundos de preparada la suspensión, tiempo en el cual se han sedimentado las arenas, midiéndose la densidad de limos y arcillas. Luego se tomó otra lectura a las 2 horas en el cual se han sedimentado los limos, quedando en suspensión las arcillas, midiéndose la densidad de ellas.

### 3.3.2 Análisis químicos

- pH. Se determinó mediante el método Potenciométrico, donde se realizó la determinación del pH con un electrodo de vidrio, teniendo en cuenta una relación agua suelo de 1:2.5.
- Carbono Orgánico. Se realizó mediante el método Walkley Black, el cual consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo con un oxidante en medio ácido, utilizando como oxidante fuerte el  $K_2Cr_2O_7$  1 N y como medio, ácido sulfúrico concentrado. La reacción de oxidación de la M.O es:



#### Reacción 3

El exceso de  $K_2Cr_2O_7$  1 N se valoró volumétricamente con sulfato ferroso amónico utilizando como indicador ferroína. Las reacciones son las siguientes:



- Capacidad de Intercambio Catiónico (C.I.C). Consistió en desplazar todos los cationes del suelo y reemplazarlos por iones  $NH_4^+$ , el suelo seco, tamizado y muy fino, se satura con  $NH_4^+$ . Posteriormente, se desplazó los iones  $NH_4^+$  adsorbidos con NaCl, obteniéndose  $NH_4Cl$  en solución que se trató con formaldehído neutro. El HCl obtenido se tituló con NaOH 0,1 N. La reacción 6 muestra lo que ocurre.



- Bases Intercambiables. Corresponden al Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio, se determinaron en el primer extracto del tratamiento con Acetato de amonio (AcONH<sub>4</sub>) de la determinación de C.I.C y la cuantificación se realizó por espectrofotometría de Absorción Atómica.

- Determinación de la acidez intercambiable. Esta hace referencia a las especies catiónicas que generan acidez potencial o cambiabile, tales iones son: El Al<sup>3+</sup> y el H<sup>+</sup>. La metodología consistió en un desplazamiento con KCl de estos iones, los cuales se titularon con NaOH en presencia de fenolftaleína. Una vez titulados estos iones, quedando de la forma Al(OH<sub>2</sub>)<sub>5</sub><sup>2+</sup> se valoró el Al<sup>3+</sup> presente en forma hidratada de acuerdo a las siguientes reacciones:



**Reacción 7**

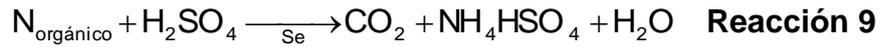


**Reacción 8**

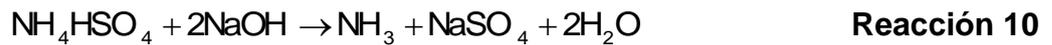
El NaOH producido se tituló con HCl y como la cantidad de NaOH depende de la cantidad de AlCl<sub>3</sub>, el número de miliequivalentes de HCl empleados para neutralizar el NaOH será igual al número de miliequivalentes de Al<sup>+3</sup>.

- Fósforo disponible. Se utilizó el método Bray II, adecuado para suelos ácidos; el cual consistió en una extracción con NH<sub>4</sub>F 0,05/HCl 0,1 N, donde el ion fluoruro precipita el calcio soluble por lo que se extrae las formas P-Ca más solubles a pH ácidos. También compleja al aluminio por lo que este extractante es específico para el CaHPO<sub>4</sub> que es soluble a pH ácido. Una vez extraído el fósforo se procedió a su determinación por el método colorimétrico en espectrofotómetro a una longitud de onda de 660 nm.

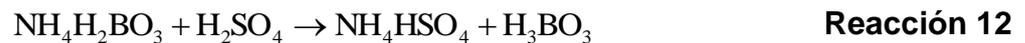
- Nitrógeno total. Se siguió el método Kjeldhal, en el cual se realizó una oxidación con ácido sulfúrico, convirtiendo el nitrógeno en sulfato ácido de amonio como se muestra en la reacción 9.



El sulfato ácido de amonio se descompone por medio de un exceso álcali para liberar el amoniaco el cual se recogió por destilación sobre ácido bórico (reacciones 10 y 11).



El borato de amonio se valoró con  $H_2SO_4$  utilizando indicador mixto (Azul de metileno-rojo de metilo) (reacción 12).



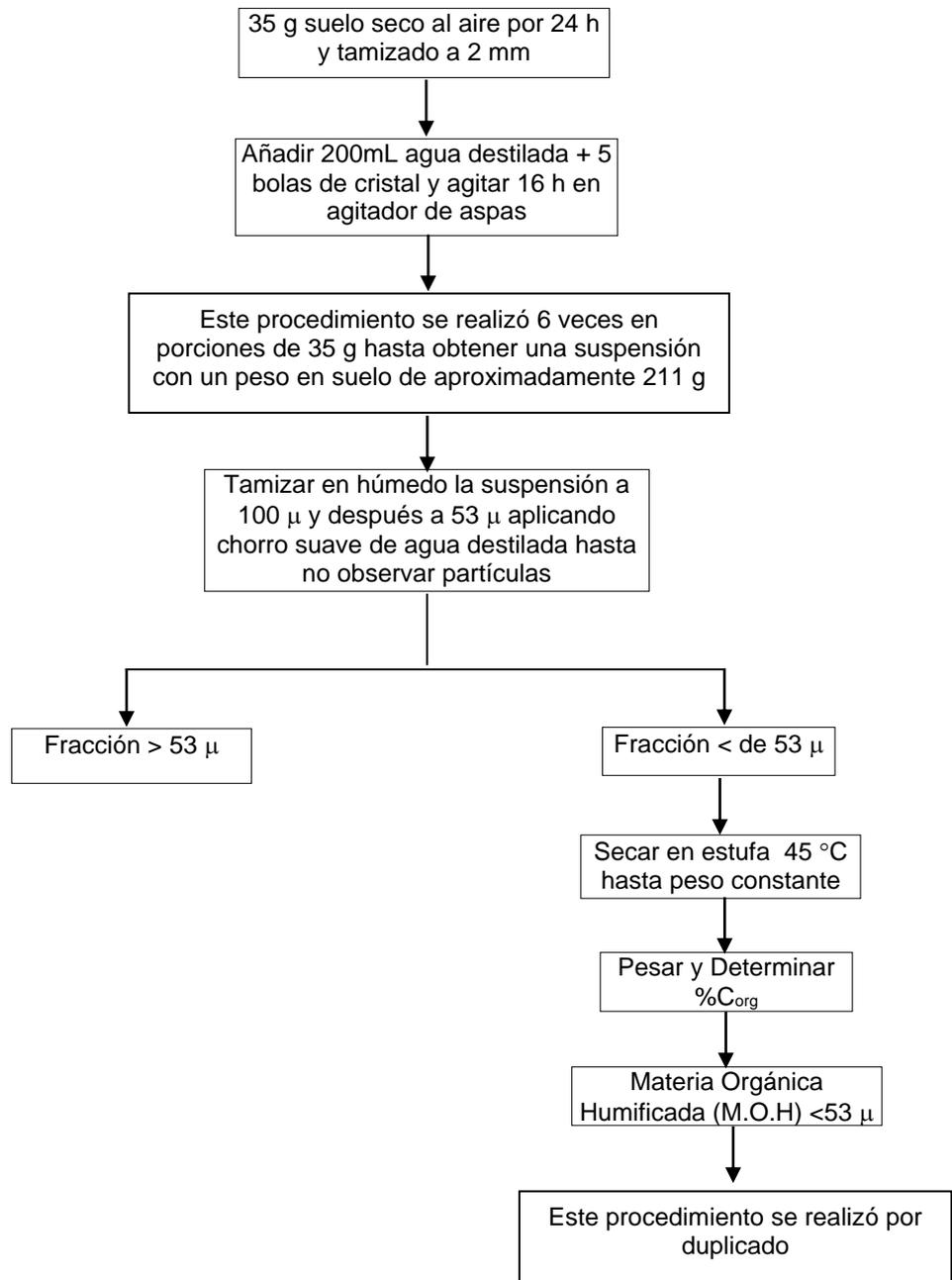
### **3.4 Separación de la materia orgánica fresca (M.O.F) y la materia orgánica humificada (M.O.H)**

Con el objeto de separar los compuestos húmicos de la materia orgánica fresca se utilizaron dos metodologías: La granulométrica y la densimétrica con el fin de garantizar la completa eliminación de la materia orgánica fresca de la fracción humificada.

#### *3.4.1 Método granulométrico*

Con este procedimiento se obtuvo la fracción menor de 53  $\mu$ , que correspondió a la materia orgánica humificada y la mayor de 53  $\mu$  a la materia orgánica libre.

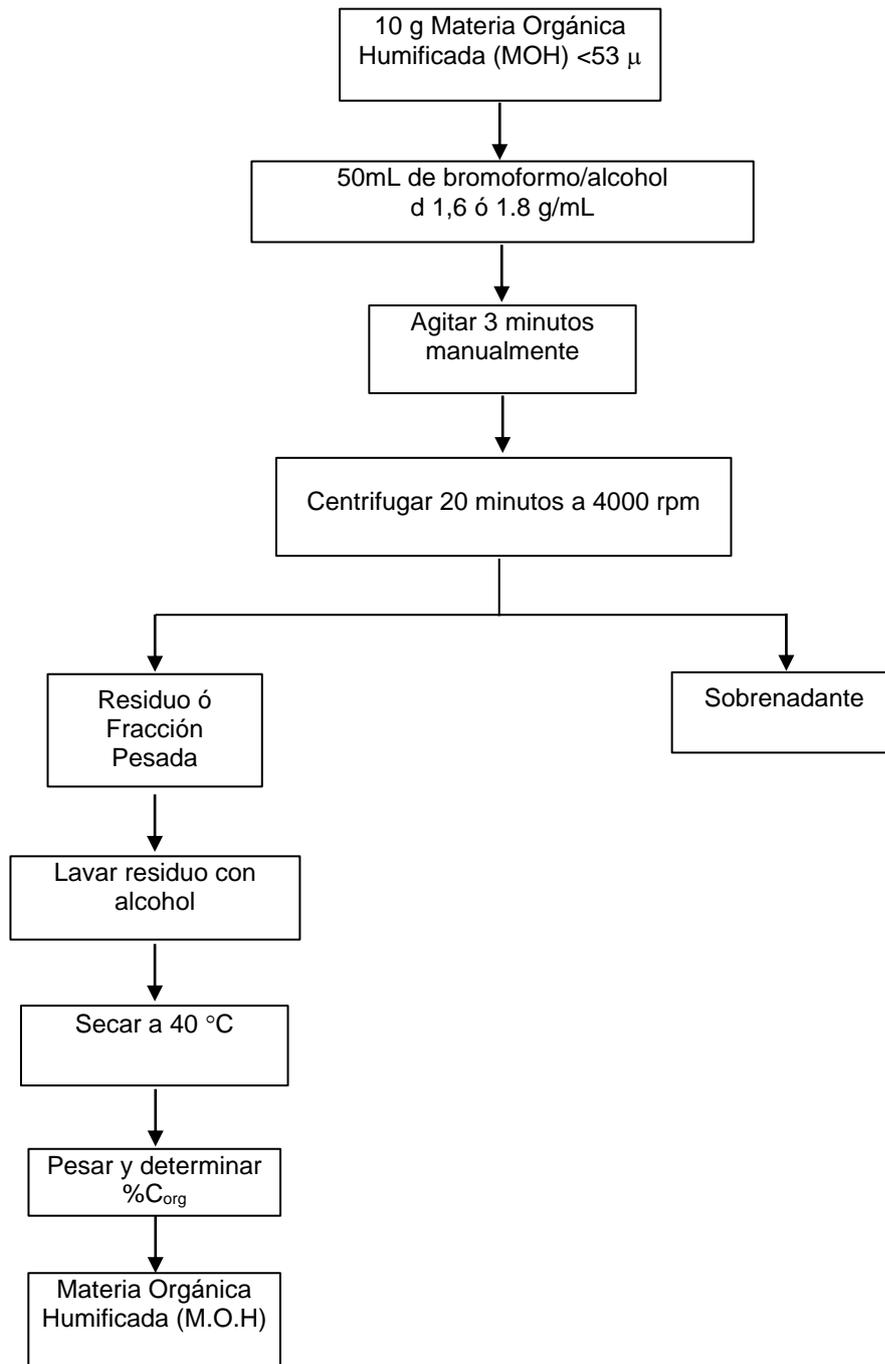
**Figura 11.** Esquema de la separación granulométrica.



### 3.4.2 Método densimétrico

Se utilizó una solución de bromoformo-etanol para completar la separación entre la materia orgánica libre (M.O.L) y la materia orgánica humificada (M.O.H), como se muestra en la figura 12.

**Figura 12.** Esquema de la separación densimétrica.



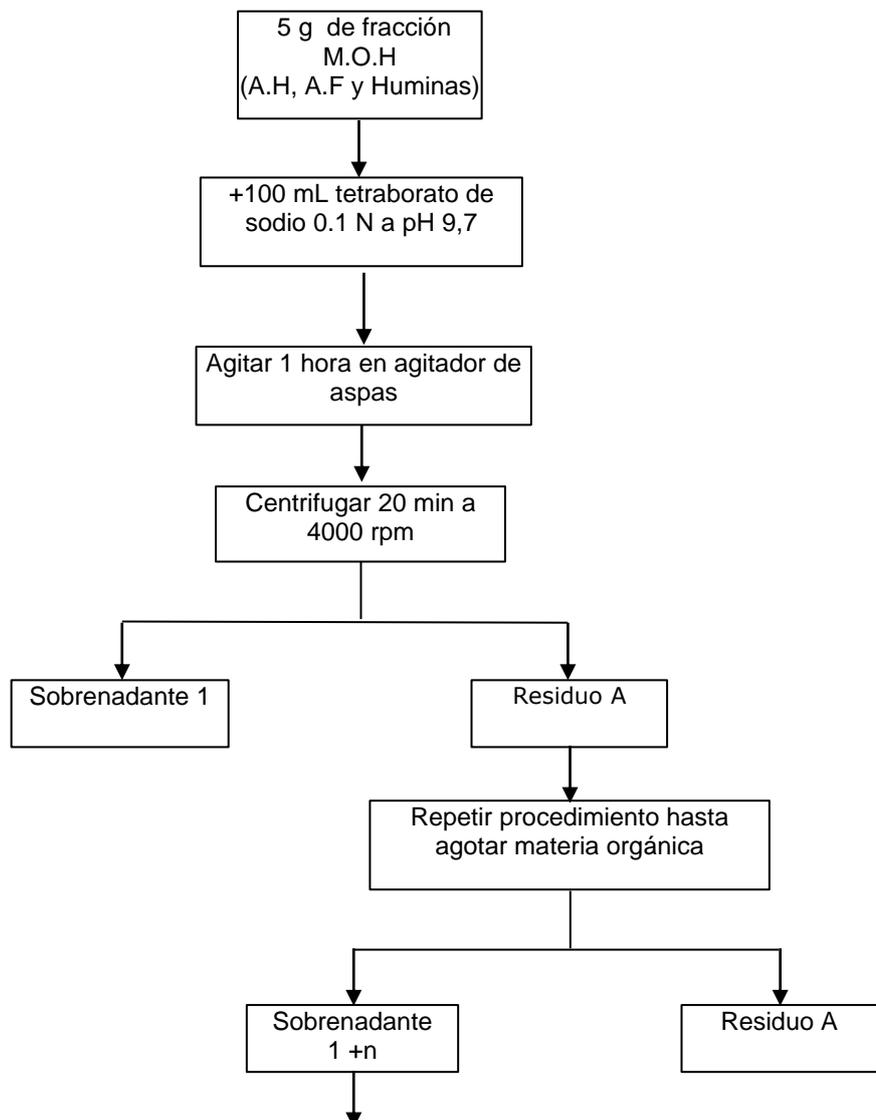
### 3.5 Extracción y separación de las sustancias húmicas

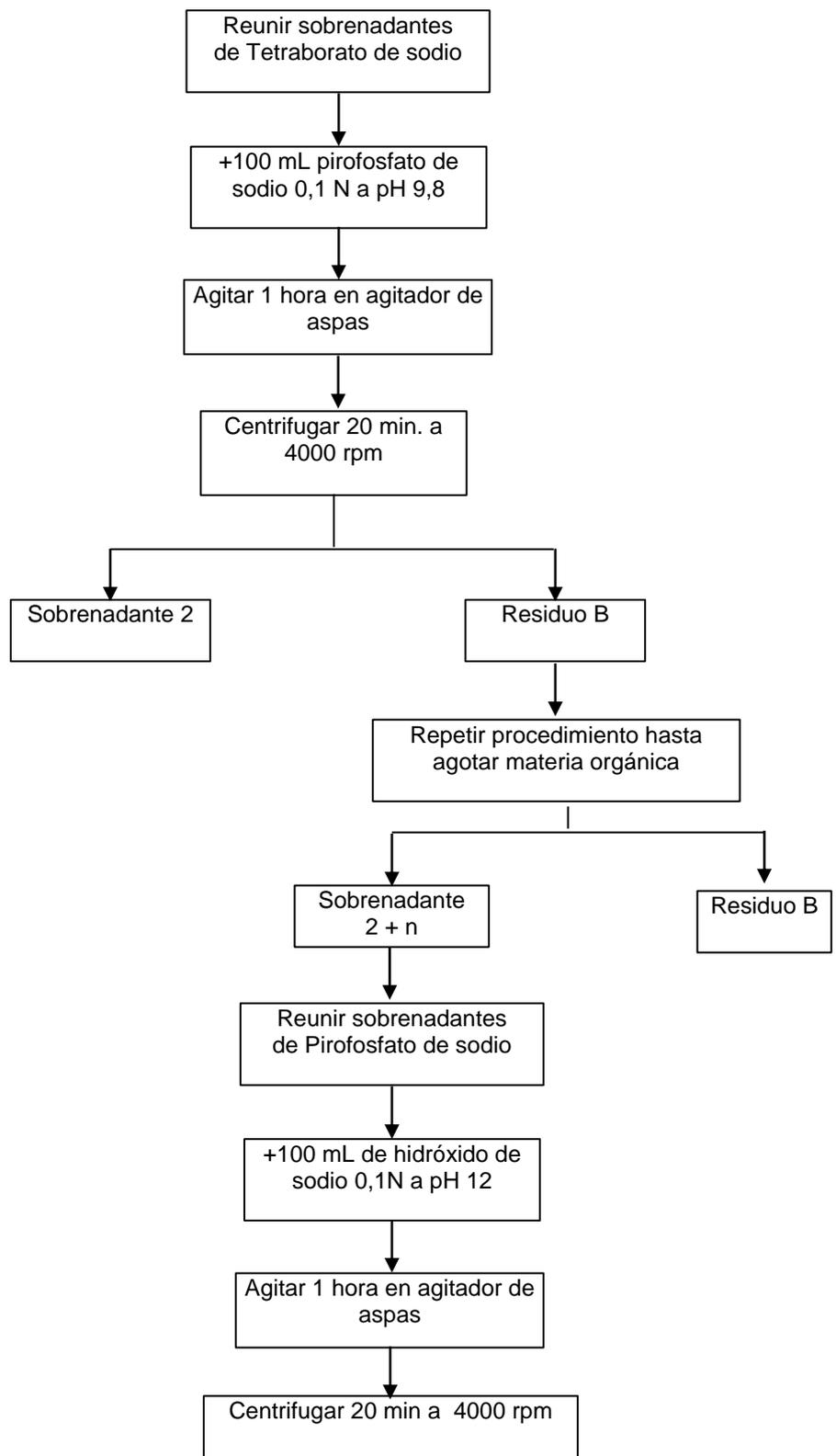
En esta etapa se inició la caracterización de la M.O propiamente dicha, o sea la M.O.H, que comprende los diversos tipos de huminas, A.F y A.H.

#### 3.5.1 Extracción de Huminas, ácidos húmicos y ácidos fúlvicos

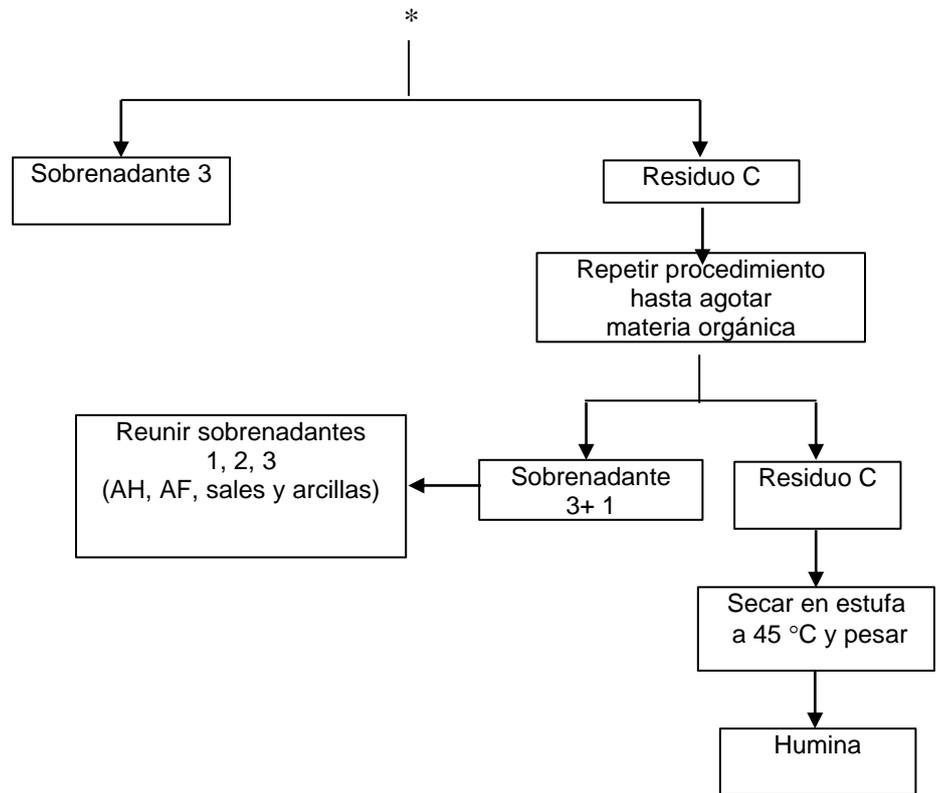
En esta etapa se hizo la separación de A.F, A:H y huminas; obteniéndose, los A.F y A:H en solución y la humina como residuo. El procedimiento realizado se muestra en la figura 13.

**Figura 13.** Extracción de huminas, ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.





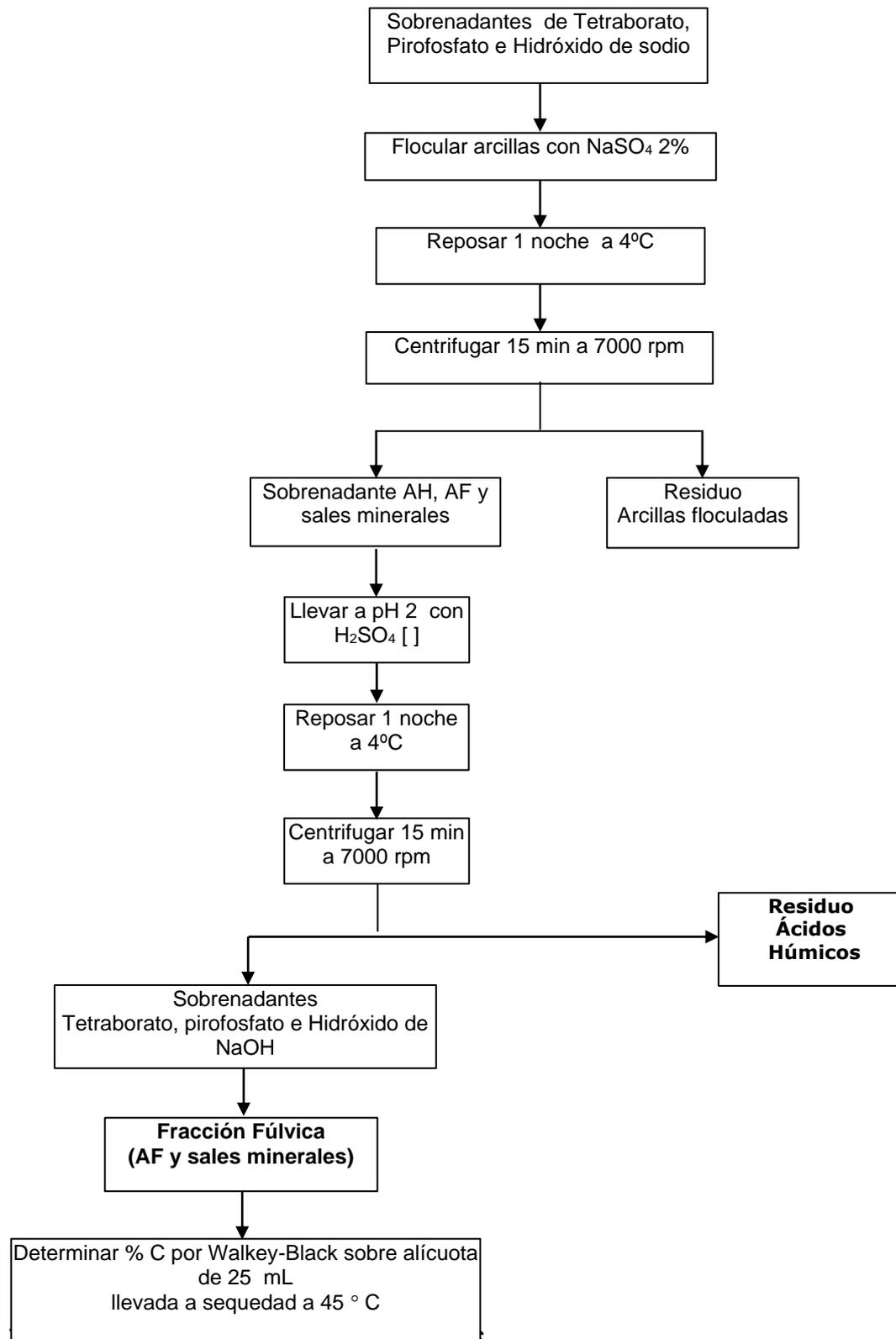
\*



### 3.5.2 Separación de los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos

En la figura 14 se muestra el procedimiento para la separación de los A.F y A:H.

**Figura 14.** Separación de los ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos.

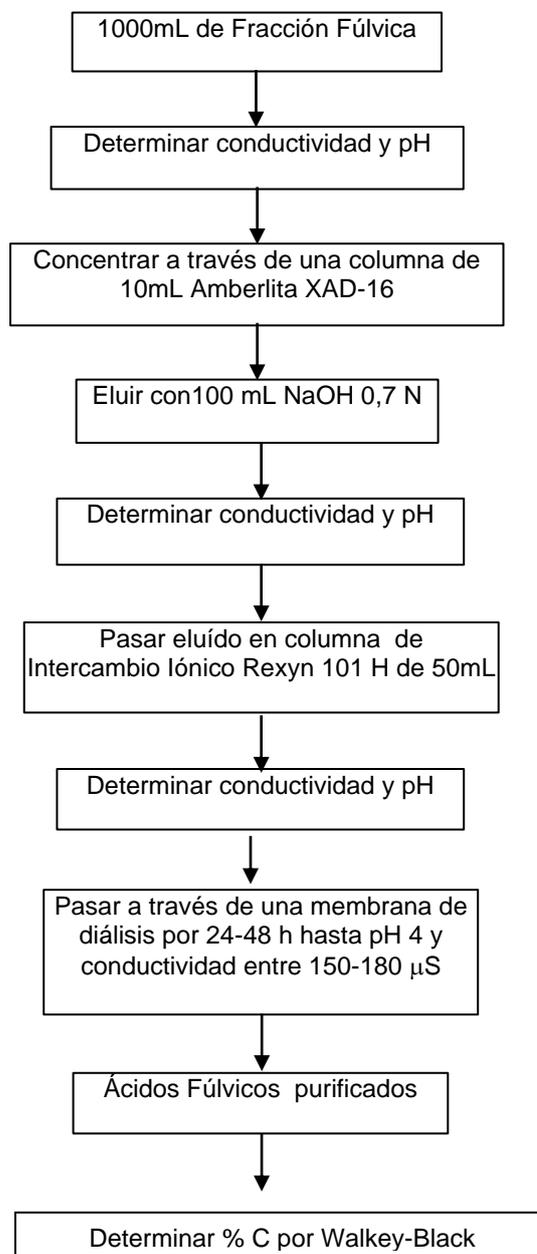


A los sobrenadantes que contienen los ácidos fúlvicos y sales minerales se les denomina fracción fúlvica (F.F).

### 3.5.3.1 Eliminación de sales de la fracción fúlvica

La purificación de los A:F se realizó mediante resinas de adsorción, intercambio y membranas de diálisis como se observa en la figura 15.

**Figura 15.** Eliminación de sales de la fracción fúlvica.



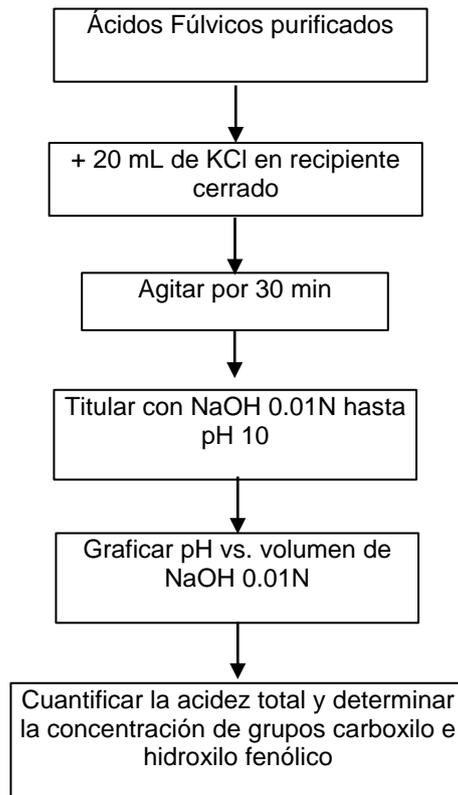
### 3.5.4 Caracterización de los ácidos fúlvicos

Con el objeto de caracterizar los A.F purificados se realizaron los siguientes análisis.

#### 3.5.4.1 Determinación de acidez total

Se hizo una titulación con volumen fijo de 0.05 mL de hidróxido de sodio en titulador automático, previo intercambio con KCl para determinar los grupos carboxilos e hidroxilos fenólicos disociados. Así se determinó el grado de sustitución y en consecuencia la capacidad de intercambio de estas macromoléculas. La figura 16 se muestra su procedimiento.

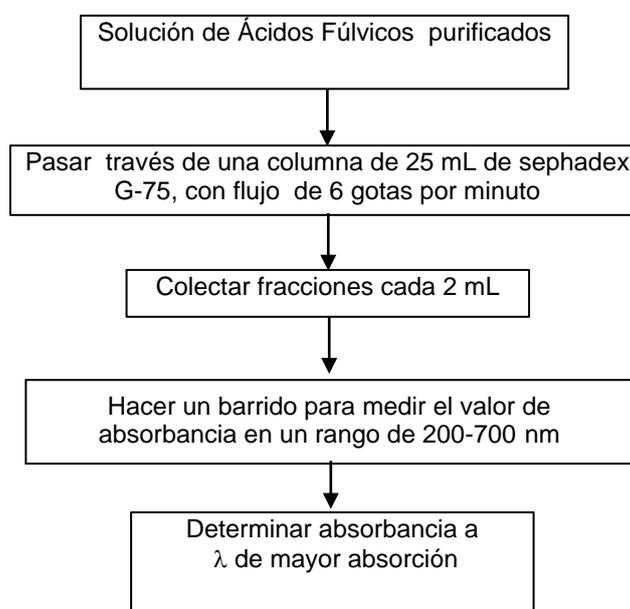
**Figura 16.** Determinación de la acidez total de los ácidos fúlvicos purificados.



### 3.5.4.2 Fraccionamiento de los ácidos fúlvicos mediante filtración a través de sephadex G-75

Con el objeto de fraccionar la macromolécula de carácter heterogénea, en fracciones más homogéneas, se hace una filtración a través de sephadex G-75, cuyo rango de fraccionamiento está entre 1000 y 50000 daltons. Como muestra en la figura 17, se realiza en una columna cromatográfica con el objeto de separar las fracciones de acuerdo al tamaño molecular.

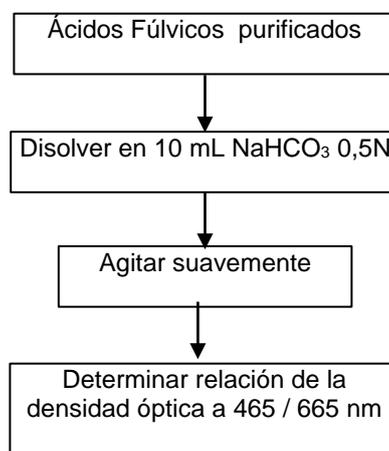
**Figura 17.** Filtración de los ácidos fúlvicos purificados a través de sephadex G-75.



### 3.5.4.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible. Relación de densidades ópticas entre 465 y 665 nm. (Relación $E_4/E_6$ )

La medida a estas dos longitudes de onda permitió conocer la densidad óptica de los A.F, que depende la estructura química, el peso molecular, el contenido de dobles enlaces conjugados; además, se determinó la relación entre el contenido de carbón aromático y el carbón de cadenas alifáticas. Esta medición se hizo sobre una dilución del ácido fúlvico en  $\text{NaHCO}_3$ . La figura 18 muestra el procedimiento.

**Figura 18.** Determinación de la relación  $E_4/E_6$ .



### 3.6 Estandarización de la técnica voltamperométrica para determinación de $\text{Cu}^{2+}$

En la tabla 3 se observan los parámetros estandarizados para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  por voltamperometría.

**Tabla 3.** Parámetros para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  por voltamperometría

Parámetro	Condiciones de trabajo
Técnica	Voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada
Electrodos	Electrodo de trabajo: Gota de mercurio suspendida Electrodo de referencia: Ag/AgCl, KCl 3.0 M Electrodo auxiliar: Platino
Método de cuantificación	Curva de adición estándar
Condiciones experimentales	Potencial de electrólisis, periodo de concentración o electrólisis
Curva de cuantificación	Curva de adición estándar en un rango de 0,05 a 0,25 ppm
Solución de medida	Muestra: De 1 a 2 mL Solución tampón/electrolito: 2 mL de ácido acético 1 N/ NaOH 1 N Solvente: Agua hasta aforar a un volumen de 10 mL Solución patrón: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 99.5%

### 3.7 Parámetros estadísticos para la estandarización de la técnica voltamperométrica para la determinación de $\text{Cu}^{2+}$

Para establecer los límites prácticos de la técnica y la metodología empleada, además de asegurar la precisión, linealidad y sensibilidad de los datos obtenidos se tomaron en cuenta los siguientes parámetros:

- Linealidad. Se preparó una solución madre de una concentración de 1000 ppm a partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  de 99.5% pureza, posteriormente se preparó una curva de adiciones estándar en un rango de 0 a 0.25 ppm de  $\text{Cu}^{2+}$ . Cada punto de la curva fue medido por triplicado.
- Precisión: Repetibilidad y reproducibilidad. Con el fin de observar el grado de concordancia entre los datos individuales y repetitividad de la técnica cada punto de la curva se midió por triplicado determinándose con estos datos la desviación estándar (s) y la desviación estándar relativa (RSD).

Para determinar la reproducibilidad del método, se determinó la concentración durante 15 días consecutivos una sola vez por día de un patrón de  $\text{Cu}^{2+}$ .

- Sensibilidad. Para calcular el límite de detección (LD) y el límite de cuantificación (LC) se simuló una matriz con los reactivos utilizados en la extracción del  $\text{Cu}^{2+}$  y se realizó una curva de adición estándar en un rango de 0 a 0.050 ppm utilizando las ecuaciones que se muestran en el anexo 2 para la obtención de los datos.

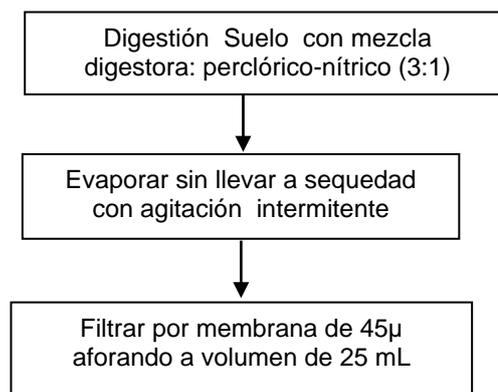
### 3.8 Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ en la muestra de suelo

Con el objeto de determinar los tipos de enlaces del  $\text{Cu}^{2+}$  en el suelo, se extraen las diferentes formas de  $\text{Cu}^{2+}$  presentes en el suelo como se relaciona a continuación:

#### 3.8.1 Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ total

Se realizó una digestión perclórico-nítrico (3:1) de acuerdo a la figura 19.

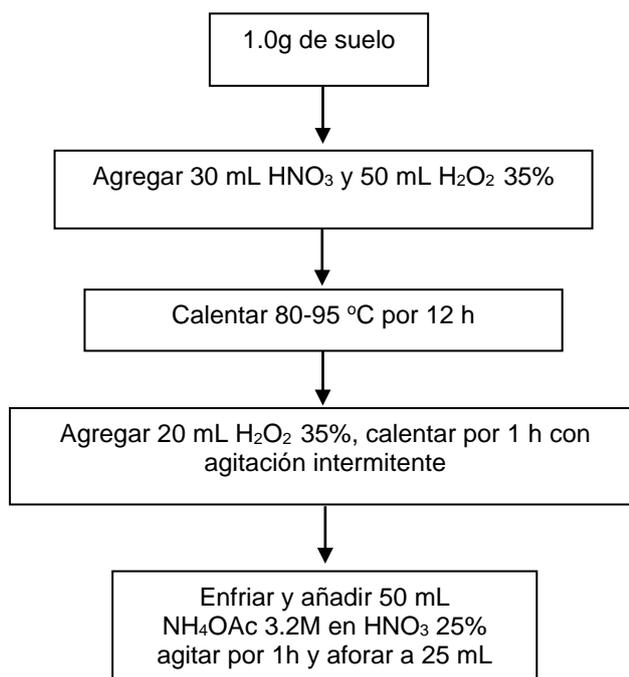
**Figura 19.** Digestión del suelo para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  total.



#### 3.8.2 Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ unido a la materia orgánica

Para determinar el  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la M.O se siguió el método basado en una oxidación de la materia con peróxido de hidrógeno. **(Kot y Namiesnik, 2000 y Davidson y colaboradores, 1999)** como se indica en la figura 20.

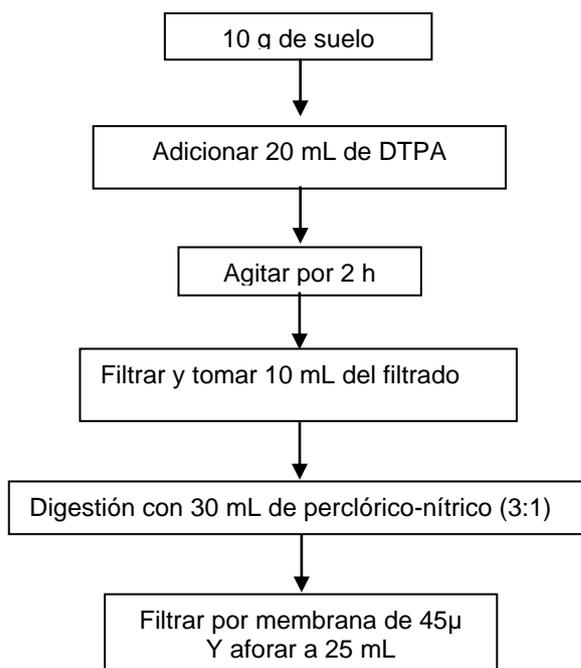
**Figura 20.** Extracción de  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la fracción orgánica del suelo.



### 3.8.3 Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ Disponible.

Se hizo mediante extracción con DTPA de acuerdo a metodología reportada por **Bravo y Giraldo (2003)** como se relaciona en la figura 21.

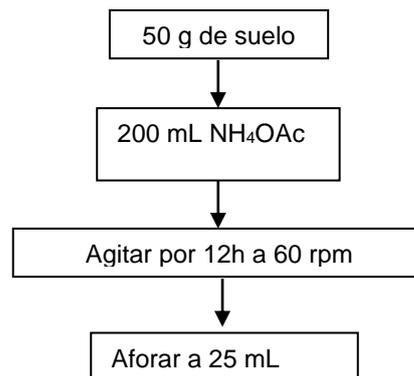
**Figura 21.** Extracción de  $\text{Cu}^{2+}$  disponible con DTPA.



### 3.8.4 Extracción de $\text{Cu}^{2+}$ intercambiable

Se realizó una extracción con acetato de amonio de acuerdo a la metodología reportada por **Tokalogiu y colaboradores, (2003)** como se relaciona en la figura 22.

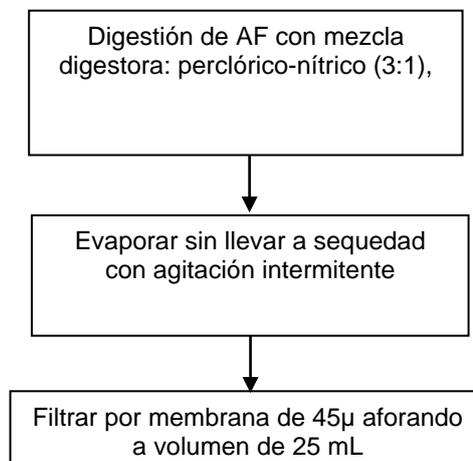
**Figura 22.** Extracción de  $\text{Cu}^{2+}$  intercambiable.



### 3.9 Determinación de $\text{Cu}^{2+}$ en los ácidos fúlvicos

Se realizó una digestión perclórico-nítrico (3:1) para ácidos fúlvicos como también para las fracciones obtenidas por sephadex G-75 de acuerdo a la figura 23.

**Figura 23.** Determinación del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la fracción de ácidos fúlvicos.



### *3.9.1 Determinación de $\text{Cu}^{2+}$ en las fracciones obtenidas por la separación sobre sephadex G-75*

Para cuantificar el Cu se utiliza la técnica de Voltamperometría de redisolución anódica de onda cuadrada mediante los parámetros óptimos para la determinación del  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes muestras analizadas.

## 4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 4.1 Análisis físicos y químicos

En la tabla 4 se encuentra los datos de la caracterización del suelo analizado en este trabajo, donde se observa 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 7,1%, indicando que esa alta retención de humedad se puede atribuir al alto contenido de 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 acidez muy fuerte detectada (**Malagón y colaboradores, 1995**) en el suelo, se puede atribuir tanto a la M.O como al aluminio intercambiable. En la tabla 4 se observa que el aluminio conserva una saturación media siendo aproximadamente 2,5 veces superior a la saturación de bases, indicando que está en un nivel no tóxico, (**Malagón y colaboradores, 1995**), implicando una pérdida progresiva de estas bases, 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 indicando 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, (**Malagón y colaboradores, 1995**) pero como se demostró, en ella contribuye mayoritariamente la acidez intercambiable y proviene principalmente de la M.O.

**Tabla 4.** Propiedades físicas y químicas del suelo andisol del departamento del Cauca.

PROPIEDADES FISICAS													
SUELO		HUMEDAD (%)				DENSIDAD REAL (g/mL)		GRANULOMETRIA			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						% SATURACION DE BASES							
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	% 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	

El alto contenido de M.O, 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; a su vez pueden 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, **(Malagón y colaboradores, 1995)** 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, pero es absorbido por las raíces generalmente bajo la forma de nitrato y 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, **(Malagón y colaboradores, 1995)**.

Además se observa una marcada deficiencia de fósforo 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 anionicamente sobre los grupos  $-NH_3^+$  de la materia orgánica.

#### **4.2 Separación de la materia orgánica humificada (M.O.H) de la materia orgánica fresca (M.O.F)**

En la tabla 5 se reportan los porcentajes de M.O.H separados por el método granulométrico realizando este procedimiento por duplicado. Se observa, una recuperación mayor al 50 % en la fracción menor de 53  $\mu$ , en la cual el 19,28%

corresponde M.O.H unida a la fracción mineral, indicando que el proceso de humificación es aún incipiente.

**Tabla 5.** Resultados de la separación de la muestra de suelo después de una separación granulométrica

MUESTRA	GRAMOS DE SUELO TAMIZADOS	% EXTRACCIÓN	%C <sub>org</sub> DE FRACCIÓN < 50 $\mu$	%MOH
Andisol	211,5200	65,61	10,67	19,28

Al utilizar el método densimétrico se obtuvo una sola fracción, indicando que toda la M.O.F fue separada mediante el método granulométrico. Por lo tanto también indicaría la efectividad del método de extracción.

### 4.3 Extracción y separación de las sustancias húmicas

En esta etapa se lleva a cabo la separación de las S.H por extracción alcalina donde en la primera etapa se tiene la separación de la humina la cual presenta insolubilidad en este tipo de sales y un porcentaje de carbono orgánico de 9,86%. Se obtuvo un residuo de color marrón oscuro correspondiente a los A.H con un porcentaje de carbono del 3% y una fracción de coloración pardo amarillo con solubilidad en medio alcalino y ácido característica de los A.F (Stevenson, 1985), con un porcentaje de carbono de 31 %, observándose que hay una mayor cantidad de A.F con respecto a los A.H

#### 4.3.1 Purificación de los ácidos fúlvicos

En la tabla 6, se observa la conductividad y el pH en el proceso de purificación de la fracción fúlvica (F.F) a través de resinas de adsorción, intercambio catiónico y membranas de diálisis. Esta F.F consta de los A.F y sales provenientes de los sobrenadantes extraídos con tetraborato, pirofosfato e hidróxido de sodio. Como se aprecia en la tabla 6, inicialmente la F.F presenta una alta conductividad y un pH fuertemente ácido debido a la extracción con ácido sulfúrico concentrado con el cual se separaron los A.H. Cuando esta

fracción se pasa a través de la resina de adsorción Amberlita XAD-16, hay una fuerte disminución de la conductividad, así como un elevado incremento en el valor de pH, estos valores indican que realmente hubo un proceso de eliminación de las sales presentes en esta fracción. El eluido alcalino de esta fracción en forma de fulvatos de sodio, posteriormente pasado a través de la resina de intercambio catiónico da como resultado una disminución más fuerte de su conductividad, que indica la eliminación de sales de sodio de la F.F, quedando nuevamente en forma de verdaderos A.F con valores de pH fuertemente ácidos debido a la elución con HCl.

Por último, estos A.F se dializan y se obtiene una solución de A.F con una mínima conductividad, aún cuando su valor es superior al del agua desionizada, debido a la neutralización de algunos grupos carboxílicos por parte de cationes presentes en el suelo. De igual forma que se obtiene un valor de pH de 3,6 inferior al del agua por la presencia de grupos carboxílicos y fenólicos que le producen acidez. De esta manera se puede asegurar que hubo un proceso de extracción y purificación al menos parcial de estos compuestos.

**Tabla 6.** Conductividad y pH de la F.F en el proceso de purificación

Parámetro	Conductividad (mS/cm)	pH
Fracción Fúlvica sin tratamiento	214,800	0,64
FF pasada por Resina de adsorción amberlita XAD-16	98,300	13,50
Resina de intercambio catiónico rexin 101-H	13,290	1,62
Membranas de diálisis de 3500daltons	0,170	3,62
Agua desionizada	0,013	5,59

#### 4.3.2 Caracterización de los ácidos fúlvicos

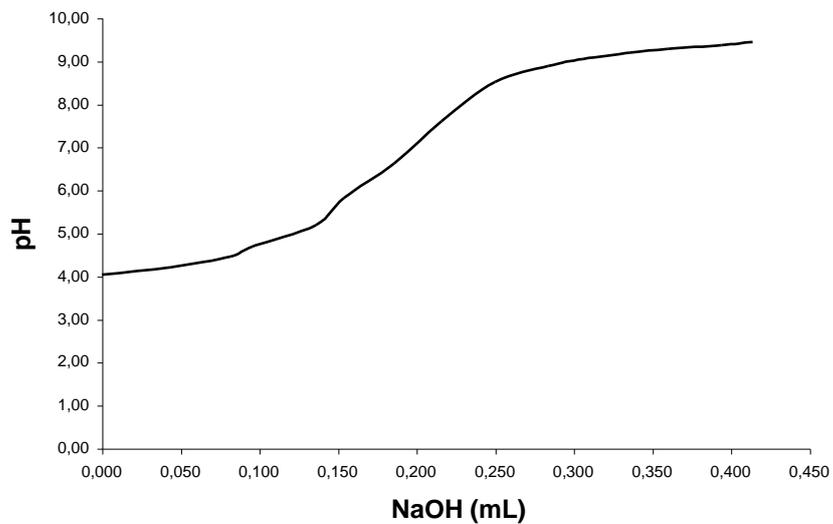
##### 4.3.2.1 Acidez total de los ácidos fúlvicos

El grado de acidez de los A.F, evaluado por titulación con NaOH, permite conocer, no solamente su reactividad, si no también estimar su capacidad para

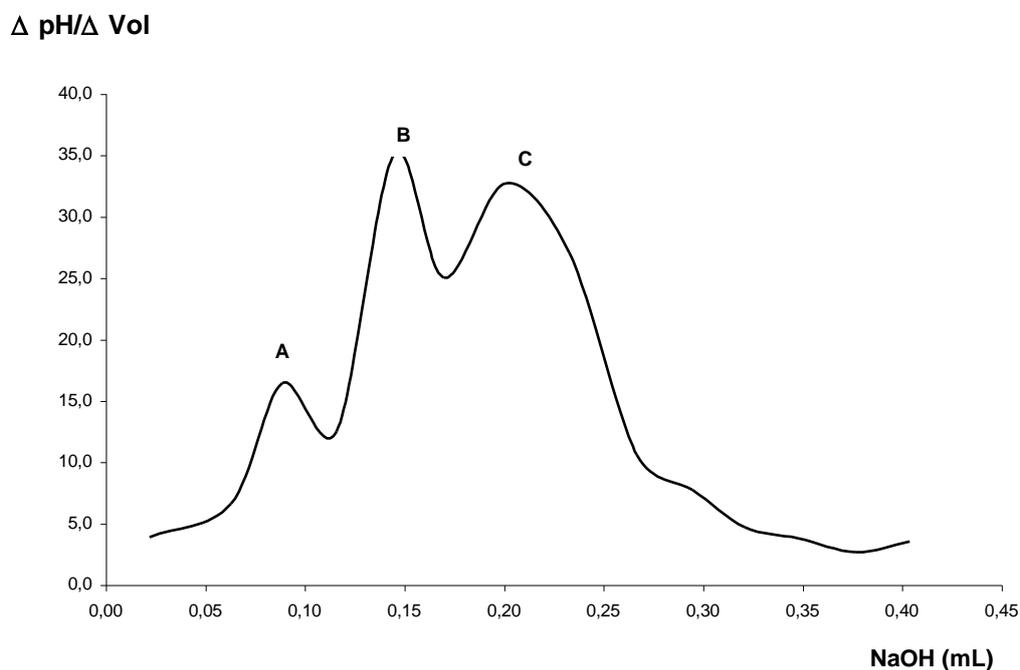
formar complejos organometálicos, quelatos o enlaces de adsorción. En la figura 24 se relacionan los resultados de la titulación con NaOH 0.0175 N y en la figura 25 la primera derivada del pH con respecto al volumen promedio.

En la figura 24 se observa una gráfica tipo sigmoïdal donde inicialmente grandes cambios en el volumen de NaOH adicionado producen pequeños cambios en el valor de pH, lo que indica un fuerte efecto o capacidad tampón de estas sustancias en un rango de 0 a 0,10mL, a partir de este punto, hay un fuerte cambio en la tendencia, ya que pequeños cambios en el volumen de NaOH agregado producen grandes cambios en el valor de pH produciendo así un cambio en la pendiente.

**Figura 24.** Curva de titulación de 5 mL de ácidos fúlvicos purificados con NaOH 0.0175N.



**Figura 25.** Primera derivada del pH con respecto al volumen promedio de NaOH agregado en la titulación de 5mL de ácidos fúlvicos purificados



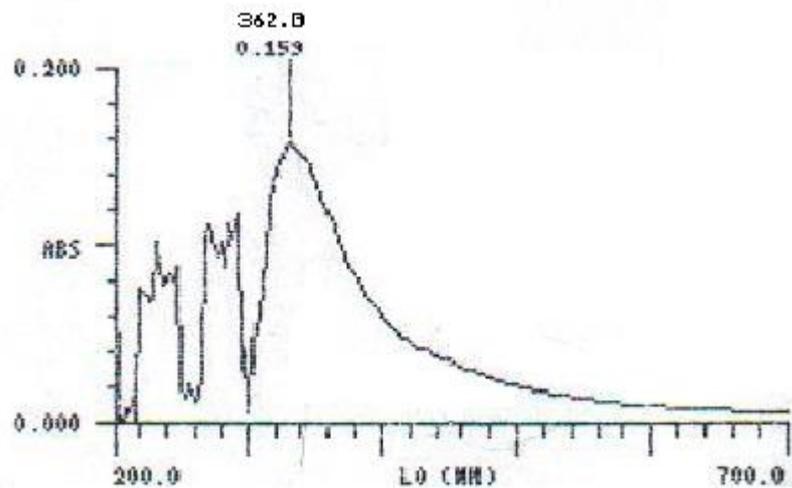
A partir de 0,25 mL se estabiliza el valor de pH lo que indica el fin de la titulación. En la figura 25, se observan tres puntos de equivalencia indicando la presencia de tres grupos ácidos titulables. El punto A a 0,089mL con un pKa = 4,2, el punto B a 0,145mL (pKa = 4,4) y el último punto C a 0,201mL (pKa = 4,7). Los pKa encontrados en la titulación de los A.F purificados oscilan en un rango de  $4,4 \pm 0,25$  que corresponden según la literatura a pKa de grupos de ácidos carboxílicos, (**Morrison y Boyd, 1990**). Estos ácidos pueden ser de tipo mono- y dicarboxílicos en cantidades iguales como establece **Simpson y colaboradores, (2001)** en su estudio de sustancias húmicas. No se detectan grupos fenólicos ni alcohólicos indicando que toda la acidez de estos ácidos corresponde a grupos de ácidos carboxílicos.

#### 4.3.2.2 Fraccionamiento de los ácidos fúlvicos sobre sephadex G-75

Debido a que los A.F están formados por varias moléculas, se hizo el fraccionamiento sobre gel de Sephadex G-75 que es una técnica útil para

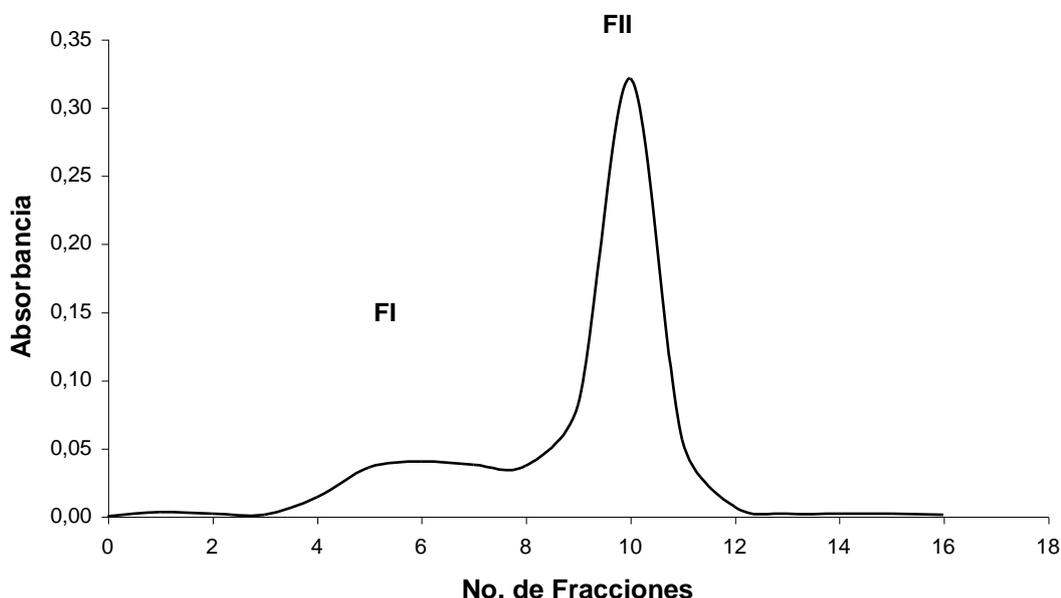
obtener fracciones homogéneas de las S.H. Inicialmente se hizo un barrido de lectura en espectrofotómetro de 200 a 700 nm de los ácidos fúlvicos purificados, con el objeto de determinar su máxima absorción. Los resultados se muestran en la figura 26. Se observa una banda de máxima absorción en el rango comprendido entre 320 y 380 nm; por lo tanto, se determinó la absorbancia a 362 nm de las fracciones eluidas de la columna de sephadex.

**Figura 26.** *Máxima absorción de los ácidos fúlvicos purificados en un rango de 200 a 700 nm.*



En la figura 27 y observan dos fracciones bien definidas: FI y FII, en donde FI corresponde a la fracción excluida y consiste en moléculas grandes con alto peso molecular superior o igual a 50000 daltons y representa el 38 % de los ácidos fúlvicos eluidos; mientras que, la fracción FII comprende a la fracción retenida, y es la fracción más abundante correspondiente al 62 %, consiste de moléculas con tamaño molecular en un rango de 1000 a 50000 daltons

**Figura 27.** Elución de los ácidos fúlvicos purificados a través de sephadex G-75.



#### 4.3.2.3 Espectroscopía Ultravioleta-Visible. Relación de densidades ópticas entre 465 y 665nm. (Relación $E_4/E_6$ )

La relación de las densidades ópticas o absorbancia ( $E_4/E_6$ ) de soluciones diluidas de A.F es útil para la caracterización de este tipo de material. Se determinó la relación  $E_4/E_6$  de las fracciones obtenidas en sephadex G-75 de los ácidos fúlvicos; obteniéndose los resultados que se indican la tabla 7. Se observa que antes de fraccionar las moléculas el valor de esta relación es de 10, valor que está muy cercano al reportado por **Kononova, (1996)** para A.F extraídos de M.O de suelos, quien describe, que la magnitud de la relación  $E_4/E_6$  se relaciona con el grado de condensación, una relación baja es indicativo de un alto grado de condensación de componentes fúlvicos aromáticos, por otro lado, un valor alto refleja un bajo grado de condensación e infiere la presencia de grandes porciones de estructuras alifáticas.

Cuando se hace el fraccionamiento por sephadex, en la fracción FI, que es la correspondiente a los A.F de mayor peso molecular, se observa una

disminución en el valor de dicha relación, confirmando lo descrito anteriormente. Mientras que la fracción FII que es la retenida en el gel debido a su menor peso molecular presenta un incremento en el valor de dicha relación reflejando así un menor grado de condensación o la mayor presencia de estructuras alifáticas. La relación  $E_4/E_6$  de los A.F sin fraccionar es la suma proporcional de la relación de las dos fracciones (FI y FII) obtenidas después de la separación por el sephadex G75.

**Tabla 7.** Relación  $E_4/E_6$  de los ácidos fúlvicos purificados y de las fracciones obtenidas por elución a través de sephadex G-75.

Muestra	Porcentaje de abundancia	Absorbancia 465	Absorbancia 665	$E_4/E_6$
Ácidos fúlvicos	100	0.009	0.090	10.00
FI	38	0.004	0.031	7.75
FII	62	0.006	0.070	11.66

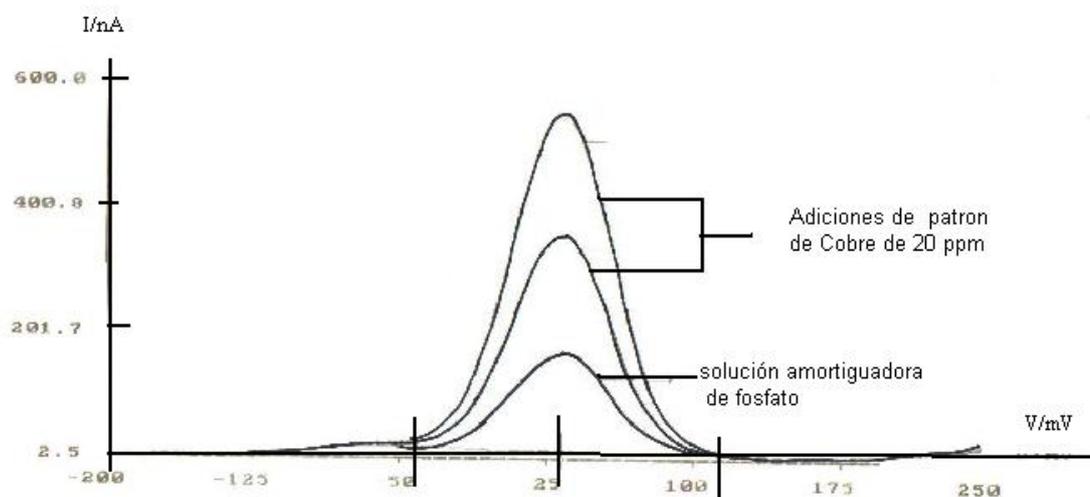
#### 4.4 Resultados de la estandarización de la técnica de voltamperometría para determinar $Cu^{2+}$

Para el estudio de  $Cu^{2+}$  en las diferentes fracciones analizadas, se optimizaron los siguientes parámetros:

##### 4.4.1 Electrolito soporte

Para la elección del electrolito soporte se tomó como referencia el boletín No. 74/1e de la Metrohm donde se utiliza el tampón de acetato a pH 4.6, que además de actuar como electrolito soporte mantiene el pH constante para la determinación de  $Cu^{2+}$  además se realizó una prueba con un .tampón de fosfato pero en este caso presento una lectura muy elevada en  $Cu^{2+}$  (Figura 28). De esta manera se utilizó el tampón de acetato el cual presentó menos lectura en  $Cu^{2+}$

**Figura 28.** Determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  con electrolito de fosfato.



#### 4.4.2 Condiciones experimentales

- Potencial de electrolisis. Se trabajó con un potencial de  $-800\text{mV}$  el cual fue adecuado para el proceso de pre-electrolisis del cation  $\text{Cu}^{2+}$  ya, que no se encontraron interferencias de otros iones que pudieran concentrarse a este mismo potencial (figura 29). El potencial de barrido se realizó en un rango de  $-300\text{ mV}$  a  $250\text{ mV}$ .
- Periodo de concentración o electrolisis. Se trabajó con un periodo de  $150\text{ s}$  tiempo en el cual se obtuvieron bajos porcentajes de error en análisis y por lo tanto generó buenos resultados en la evaluación de los datos.
- Tamaño de la gota de mercurio. Se tomó como primer valor un tamaño de  $4$  el cual no presentó problemas en las determinaciones. Por lo tanto todos los análisis se realizaron con este valor.
- Velocidad de Agitación. Este paso es muy importante porque permite que aumente la sensibilidad y movilidad de los cationes hacia el electrodo de trabajo, en donde es amalgamado y reducido (Reacción 11).

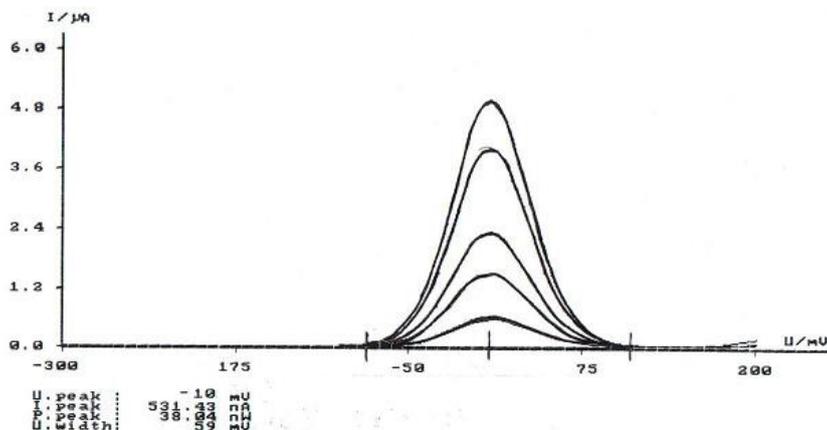


Se trabajo con una velocidad de 2000 rpm donde se observo una buena respuesta (figura 29).

- Potencial de reconocimiento. El potencial de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$  se determinó mediante adiciones patrón de soluciones diluidas de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 99,5% dando como resultado un potencial de  $-10 \pm 1.73$  mV. (Figura 29). Este potencial presentó una desviación de 8 relativamente alta, al trabajar en diferentes fracciones obtenidas del suelo, por lo tanto se presenta el potencial de reconocimiento para las diferentes fracciones en un rango de  $5 \pm 8$  mV. En las figuras 32-34, 36 y 38 puede observarse este comportamiento.

La figura 29, muestra un voltamperograma de soluciones estándar de  $\text{Cu}^{2+}$  en el cual se observa que los parámetros optimizados originan gráficas con formas gaussianana definidas, reproducibilidad, y corrientes altas las cuales permiten medidas sin interferencias.

**Figura 29.** Adiciones patrón de estándares de  $\text{Cu}^{2+}$  en un rango de 0 a 0,05 ppm.



En la tabla 8 se resume la secuencia operacional óptima para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Tabla 8.** Parámetros óptimos para determinar  $\text{Cu}^{2+}$  en suelo mediante voltamperometría de redisolución anódica.

<b>Parámetros</b>	
Potencial de electrolisis <b>U.meas</b>	-800 mV
Tiempo electrolisis <b>MEAS</b>	150 s
Tamaño gota Hg <b>Drop size</b>	4.0
Potencial inicial <b>U. start</b>	-300 mV
Potencial final <b>U.end</b>	250 mV
Velocidad de agitación <b>Rot. speed</b>	2000/min
Potencial de reconocimiento <b>U. verify</b>	$5 \pm 8$ mV
Tiempo de Barrido <b>Sweep</b>	28,5 s
Purga ( $\text{N}_2$ )	300 s
Electrolito soporte	NaOH / $\text{CH}_3\text{COOH}$ (pH=4,6)
Electrodo de Trabajo ( <b>WE</b> )	Gota de Mercurio (HMDE)
Electrodo de referencia ( <b>RE</b> )	Ag/AgCl
Electrodo Auxiliar ( <b>AE</b> )	Pt
Modo	Onda Cuadrada

#### 4.4.3 Método de cuantificación

Para la determinación de  $\text{Cu}^{2+}$  se empleo curva de adiciones estándar en donde se encontraron coeficientes de correlación (r) con valores de 0,999, adecuados para la cuantificación del  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes fracciones obtenidas del suelo.

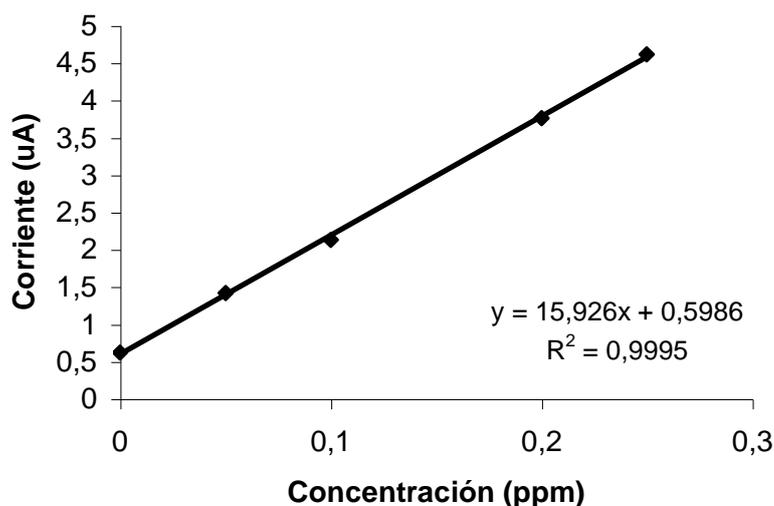
#### 4.4.4 Parámetros estadísticos para la estandarización de la técnica voltamperométrica

- Linealidad. Se estudio la linealidad construyendo una curva de adición estándar en un rango de 0 a 0,25 ppm graficando la corriente en función

de la concentración. La linealidad determina la región de la curva respuesta o de cuantificación, en que hay relación directa entre la señal instrumental y la concentración del producto analizado, siendo lineal en donde el área bajo la curva es proporcional a la concentración. La curva se construyó teniendo en cuenta los parámetros voltamperométricos y experimentales especificados en la tabla 8.

La curva de la figura 30, se obtuvo graficando las corrientes en función de diferentes concentraciones de una solución de  $\text{Cu}^{2+}$  en un rango entre 0 y 0.25 ppm. El método es lineal y presenta un coeficiente de correlación ( $R^2$ ) igual a 0.999.

**Figura 30.** Curva de adición estándar en un rango de 0 a 0,25 ppm para evaluar linealidad.



- Precisión

Repetibilidad. Para determinar la precisión del método se midió por triplicado la corriente de cada uno de los puntos del curva patrón de  $\text{Cu}^{2+}$  y se calculó la desviación estándar y la desviación estándar relativa de las corrientes obtenidas con el fin de evaluar la repet  $r = 0,999$  (o 2). Los datos se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9.** Concentraciones estándar de Cu<sup>2+</sup> y sus respectivas desviaciones estándar en un rango de 0 a 0,050ppm.

Concentración de Cu <sup>2+</sup> (ppm)	U. Verify (mV)	Corriente 1 (μA)	Corriente 2 (μA)	Corriente 3 (μA)	Corriente promedio (μA)	s	RSD (%)
0	-6	0,1265	0,1256	0,1276	0,1265	0,0010	0,79
0,0125	-6	0,4148	0,4350	0,4349	0,4282	0,0116	2,71
0,0250	-5	0,6389	0,6632	0,6729	0,6583	0,0175	2,66
0,0500	-5	1,1760	1,2170	1,1970	1,1970	0,0208	1,74

Reproducibilidad. Con el fin de evaluar esta variable se midió por triplicado durante quince días una sola vez por día, una solución de Cu<sup>2+</sup> obteniéndose los datos, que se indican en la tabla 10.

**Tabla 10** Reproducibilidad de las concentraciones de un estándar de Cu<sup>2+</sup> en un periodo de 15 días.

Concentración referencia	Días analizados	Concentración (ppm)	%porcentajes de error con respecto a concentración referencia	s	RSD (%)
45 ppm	1	44,63	0,82	1,05	2,31
	3	47,11	4,70		
	9	45,32	0,71		
	15	46,02	2,27		

En las tabla 9 y 10 se puede observar que la precisión intraensayo (repetibilidad) y la precisión interensayo (reproducibilidad) medida como desviación estándar relativa (RDS) es menor del 5 %, lo cual demuestra que el método analítico cumple con los requisitos de precisión.

- Sensibilidad. La sensibilidad del método voltamperométrico se evalúa determinando el límite de detección y el límite de cuantificación para lo cual se construyó una curva de calibración con unas concentraciones en el rango de 0 a 0,050 ppm, menores a las concentraciones de las

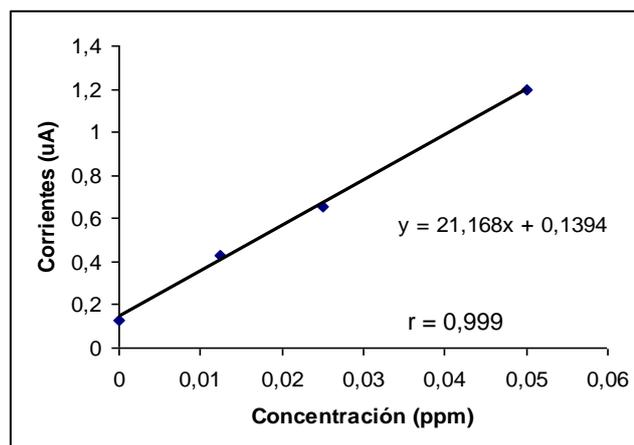
curvas de cuantificación, simulando una matriz con los reactivos utilizados.

Con las corrientes promedios y las concentraciones mostradas en la tabla 11 se realizó una curva (figura 31) para determinar la pendiente y el intercepto los cuales son utilizados en las fórmulas que se presentan en el anexo 2 para la determinación del LD y LC del  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes fracciones de suelo analizadas.

**Tabla 11.** Concentraciones del estándar de  $\text{Cu}^{2+}$  y sus respectivas corrientes en un rango de 0 a 0,05ppm para calcular el LD y LC.

Concentración de $\text{Cu}^{2+}$ (ppm)	V. Verif (mV)	Corriente 1 ( $\mu\text{A}$ )	Corriente 2 ( $\mu\text{A}$ )	Corriente 3 ( $\mu\text{A}$ )	Corriente promedio ( $\mu\text{A}$ )
0	-6	0,1265	0,1256	0,1276	0,1265
0,0125	-6	0,4148	0,4350	0,4349	0,4282
0,0250	-5	0,6389	0,6632	0,6729	0,6583
0,0500	-5	1,1760	1,2170	1,1970	1,1970

**Figura 31.** Curva de adición estándar para determinar el LD y LC del método utilizado.



En la tabla 12 se presentan los resultados del límite de detección y cuantificación con las cuales se evalúa la capacidad del método para detectar cantidades residuales del  $\text{Cu}^{2+}$ .

La menor concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  detectada (LD) es de 0,05 ppm, valor que concuerda con **Tokalogiu y colaboradores, (2003)**, quien reporta un límite de detección en un rango de  $0,045 \pm 0.02$  ppm para  $\text{Cu}^{2+}$  en suelo mediante la técnica de absorción atómica. Además se encontró que el límite de concentración más pequeña (LC) que se puede cuantificar cuando se utiliza este tipo de matrices fue de 0,18 ppm.

**Tabla 12.** Límite de detección y cuantificación para el  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes fracciones analizadas.

Metal	$\text{Cu}^{2+}$	
Desviación estándar de la pendiente ( $S_B$ )	0,39	
Intercepto con el eje y ( $Y_B$ )	0,1394	
Valor Y	1,3095	Límite de detección (ppm) 0,05
	4,0395	Límite de cuantificación (ppm) 0,18

#### 4.5 Determinación de $\text{Cu}^{2+}$ en las diferentes fracciones extraídas del suelo

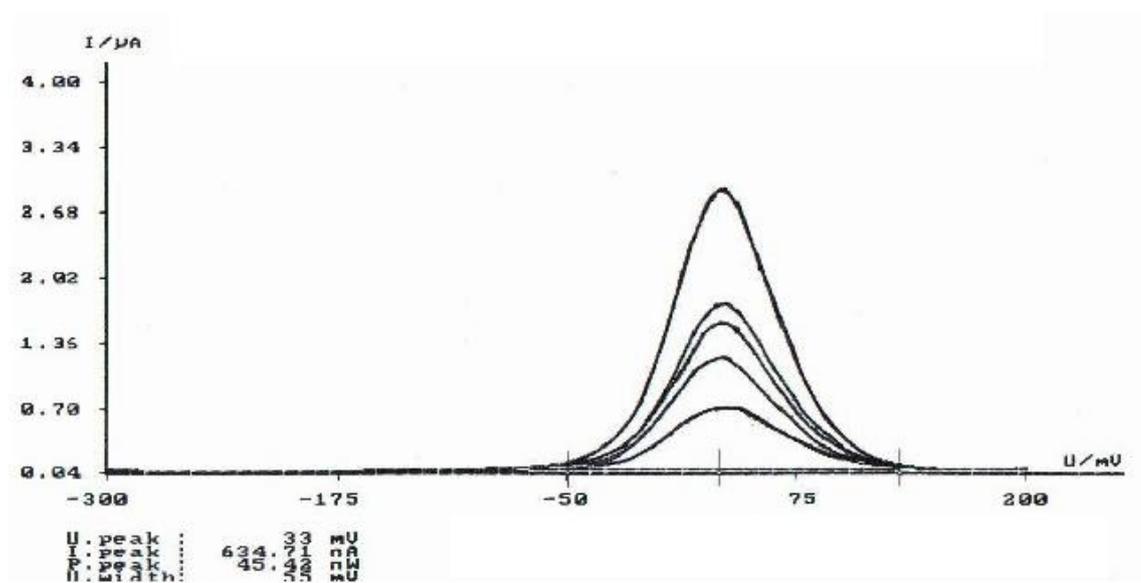
##### 4.5.1 Determinación del $\text{Cu}^{2+}$ total

De acuerdo a los parámetros estandarizados reportados en la tabla 8, el potencial de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$  fue de  $5 \pm 8$  mV. Al realizar la digestión en mezcla ácida para extraer el  $\text{Cu}^{2+}$  total, fue necesario evaluar diferentes relaciones entre la cantidad de suelo y la mezcla digestora, con el propósito de hallar la más adecuada, encontrándose que si la digestión es insuficiente, el pico de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$  en el voltamperograma se corre hacia potenciales muy positivos, alejándose del potencial de reconocimiento, como se aprecia en la figura 32. De esta manera, se encontró que para determinar el  $\text{Cu}^{2+}$  total una relación adecuada entre el suelo y la mezcla digestora ácida es

de 1:100 para la cual el potencial fue de 8 mV (Figura 33). Relación alta atribuible probablemente a que más del 50 % del  $\text{Cu}^{2+}$  en este suelo se encuentra unido a la M.O formando probablemente complejos muy estables que dificultan su rompimiento.

El contenido de  $\text{Cu}^{2+}$  total en la muestra de suelo analizada fue de  $46.61 \pm 1.63$  ppm el cual está dentro del rango reportado por **Tokalogiu y colaboradores, (2003)** (tabla 13) para suelos de Turquía.

**Figura 32.** Influencia de la relación suelo:mezcla digestora sobre el potencial de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$ .



**Tabla 13.** Concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes fracciones del suelo

Fracción	Concentración ( $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ suelo )	
	Valor Encontrado	Rango reportado <sup>a</sup>
Intercambiable	N.D <sup>c</sup>	0 – 2,43
Disponibile	$4.4 \pm 0.51$	3-4 <sup>b</sup>
Orgánico	$26,54 \pm 3,21$	0,1 – 9,34
Cu-AF	0.24	NR <sup>d</sup>
Total	$46,61 \pm 1,63$	5,95 – 76,1

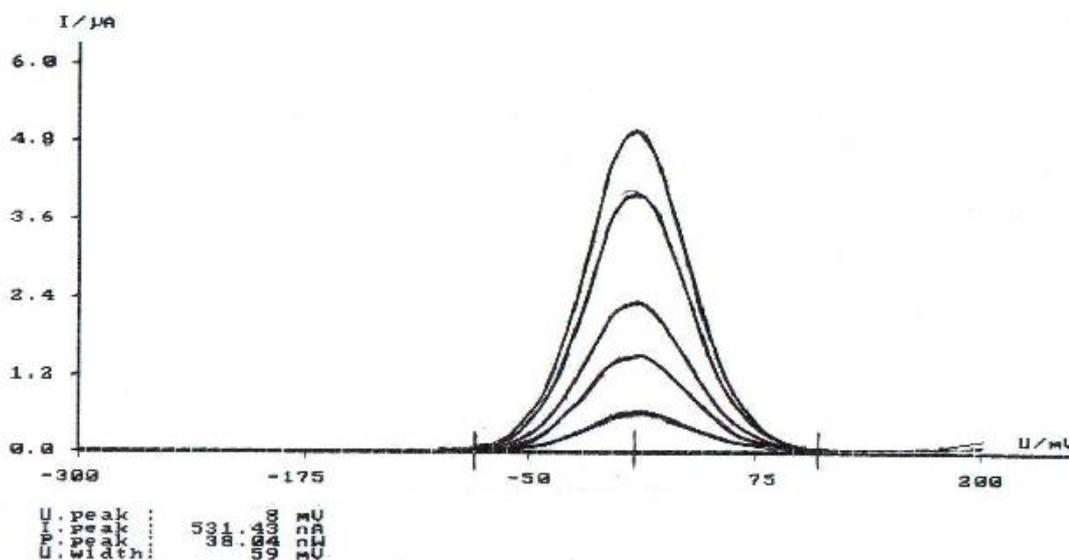
<sup>a</sup> Tokalogiu, 2003.

<sup>b</sup> Malagón, 1995

<sup>c</sup> No detectado

<sup>d</sup> No reportado

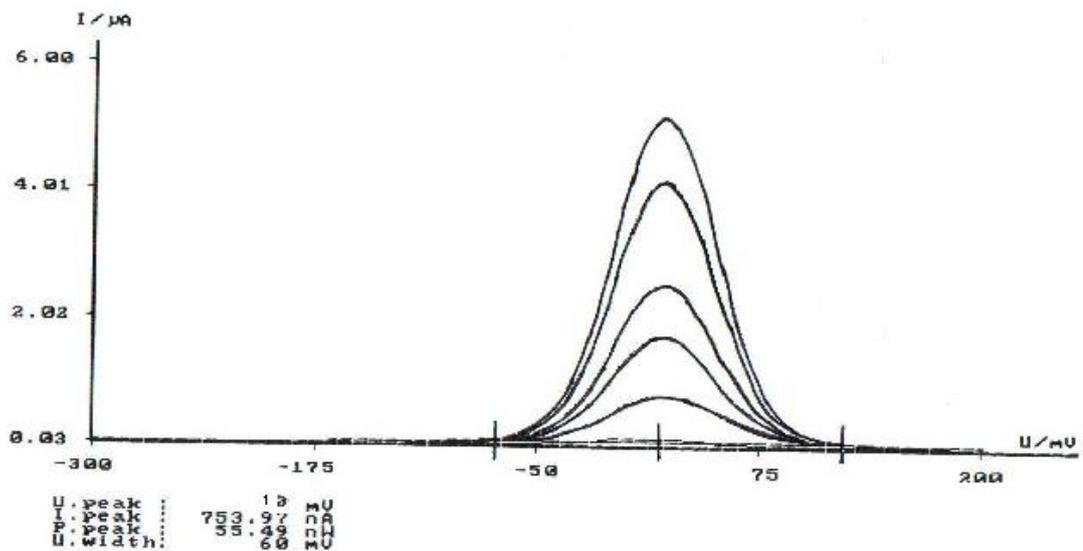
**Figura 33.** Potencial de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$  con una relación suelo : mezcla digestora optima ( 1:100)



#### 4.5.2 Determinación del $\text{Cu}^{2+}$ en la fracción orgánica

En la figura 34 se muestra el voltamperograma del  $\text{Cu}^{2+}$  liberado de la M.O; se observa que el potencial de reconocimiento está un poco desplazado (10 mV) con respecto al potencial encontrado cuando se trabaja con patrones ( $-10 \pm 1.73$ ), esto posiblemente al efecto de la matriz en la cual se está trabajando o de otra parte, a la presencia de complejos de  $\text{Cu}^{2+}$  que estén interfiriendo en la medida

**Figura 34.** Voltamperograma del  $\text{Cu}^{2+}$  perteneciente a la fracción orgánica.

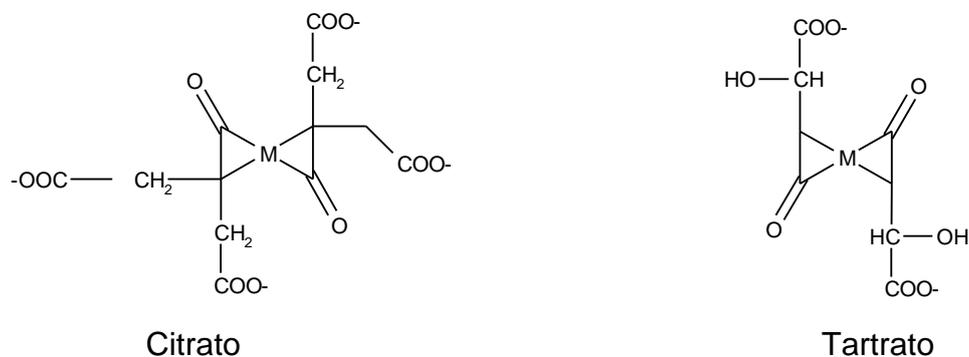


Como se observa en la tabla 13 el valor obtenido del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a la M.O es de  $26,54 \pm 3,21 \text{ pm}$  correspondiente al 57 % del  $\text{Cu}^{2+}$  total (figura 37). Este valor está por encima del rango establecido por **Tokalogiu y colaboradores, (2003)** (0.1 – 9.34), y se puede atribuir al alto porcentaje de M.O encontrado en este suelo (14.7%) indicando afinidad del cation para unirse a la materia orgánica del suelo.

La M.O puede estar formando complejos ya sea por adsorción o complejación del catión metálico con ligandos orgánicos. De acuerdo a **Stevenson (1985)** los ligandos pueden ser: compuestos de materia orgánica sin humificar tales como aminoácidos, ácidos carboxílicos, azúcares, proteínas simples, etc. Se han reportado gran número de ácidos orgánicos en el suelo tales como: acético oxálico acrílico, propiónico, láctico, butírico, fumárico, esteárico, pero los más efectivos en formar quelatos son los di y tri carboxílicos.

Los aminoácidos y proteínas poseen varios grupos funcionales ( $\text{NH}_2$  -  $\text{COOH}$  -  $\text{SH}$ ) capaces de quelatar este cation. Algunos tipos de complejos formados por ácidos orgánicos se observan en figura 35.

**Figura 35.** Estructuras de complejos orgánicos.



Además el  $\text{Cu}^{2+}$  puede ser fuertemente quelatado por compuestos de materia orgánica humificada tales como ácidos fúlvicos, ácidos húmicos, etc. **(Stevenson, 1985)**.

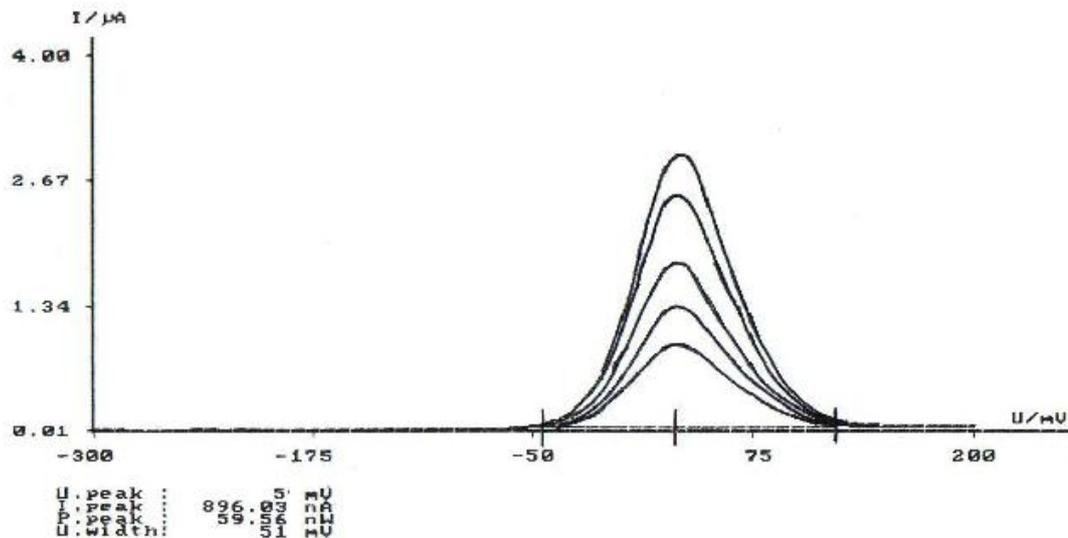
Es importante recalcar de esta manera el papel que juega la M.O.H del suelo en el sentido de no permitir que estos cationes metálicos pasen totalmente a la solución del suelo, porque pueden causar toxicidad a las plantas y su lixiviación a horizontes más profundos ocasionan perjuicios a los organismos de los cuerpos de agua. De otra parte, el  $\text{Cu}^{2+}$  retenido por la M.O se constituye en una fuente potencial de nutriente para las plantas.

#### 4.5.3 El cobre disponible

La extracción del  $\text{Cu}^{2+}$  disponible se hizo con una solución de DTPA, el cual forma un complejo estable y para liberarlo una vez complejado fue necesario realizar 2 digestiones sucesivas hasta obtener el valor óptimo del potencial de reconocimiento de este elemento por la técnica de voltamperometría de redisolución anódica. Se registró un valor de 4.4ppm de  $\text{Cu}^{2+}$  disponible, (Tabla 13), el cual está muy próximo al rango crítico reportado para suelos Colombianos **(Malagón y colaboradores, 1995)**; esto indica que los niveles de  $\text{Cu}^{2+}$  no presentan toxicidad para este tipo de suelos, demostrando

nuevamente la efectividad de la M.O.H en el sentido de complejar fuertemente este metal e impedir que pase a la solución del suelo y causar toxicidad; a pesar de ser un suelo muy fuertemente ácido, en donde el  $\text{Cu}^{2+}$  estaría soluble. Se encontró que al realizar dos digestiones sucesivas es posible cuantificar el  $\text{Cu}^{2+}$ ; ya que es liberado del complejo formado, este comportamiento fue evidenciado ya que el potencial de reconocimiento está a valores muy próximos al potencial cuando se trabaja con patrones (Figura 36).

**Figura 36.** Voltamperograma del  $\text{Cu}^{2+}$  disponible en el suelo.

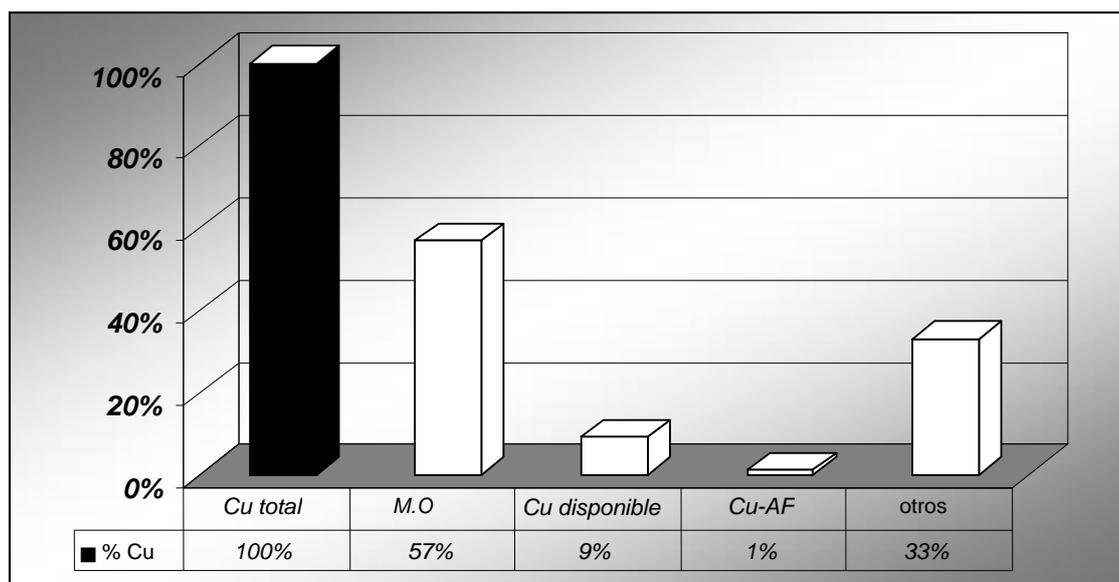


#### 4.5.4. El cobre intercambiable

En la tabla 13, se observa que no fue posible obtener un valor para el  $\text{Cu}^{2+}$  intercambiable debido posiblemente a sus bajas concentraciones las cuales pueden estar por debajo del límite de detección (0,05ppm), indicando que este metal no está ligado superficialmente ni a la M.O ni a las arcillas que componen la fase coloidal y que como se refirió anteriormente, estaría fuertemente ligado a los complejos formados por la M.O; de esta manera se puede inferir que el  $\text{Cu}^{2+}$  de este suelo presenta una baja movilidad.

El porcentaje de  $\text{Cu}^{2+}$  del total que no corresponde a ninguna de las anteriores fracciones, probablemente es inorgánico, unido a óxidos de Fe y Mn o de Al y comprende un 33% (figura 37)

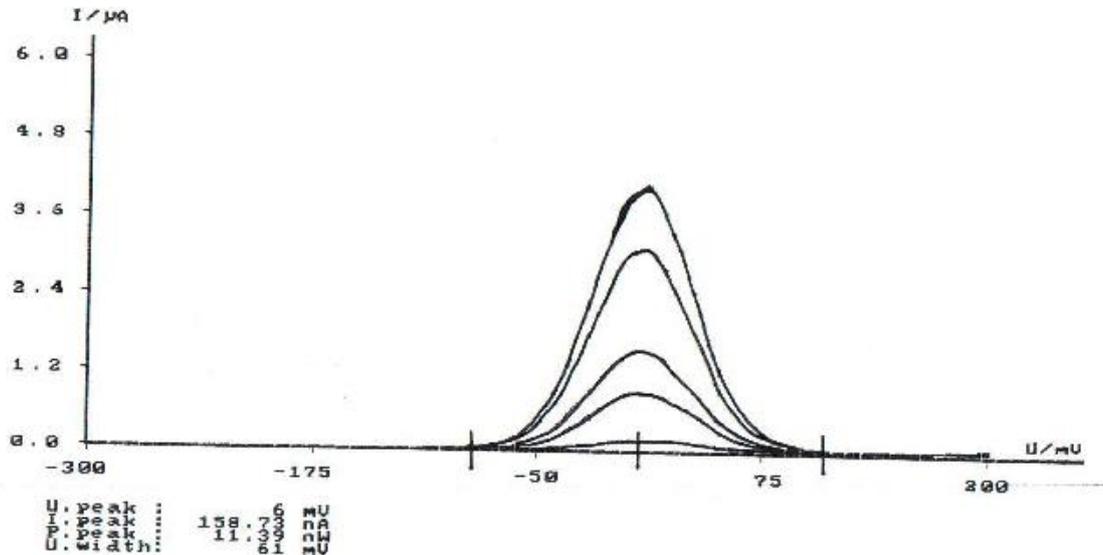
**Figura 37.** Distribución del  $\text{Cu}^{2+}$  en las diferentes fracciones del suelo.



#### 4.5.5 Determinación del $\text{Cu}^{2+}$ en la fracción de ácidos fúlvicos

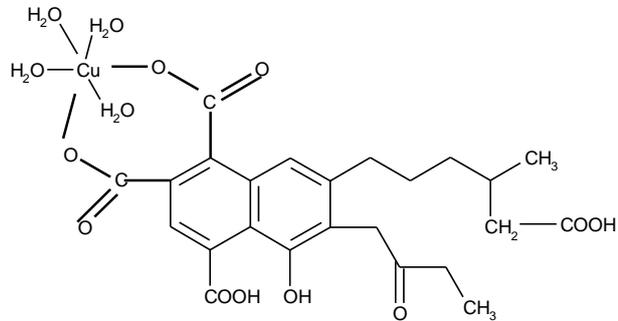
En la figura 38, se observa el voltamperograma del  $\text{Cu}^{2+}$  correspondiente a los ácidos fúlvicos después de una digestión para obtenerlos en su forma libre, se obtuvo un potencial de reconocimiento del  $\text{Cu}^{2+}$  de 6 mV el cual está dentro del rango establecido para las fracciones de suelo analizadas.

**Figura 38..** Voltamperograma de los ácidos fúlvicos purificados.

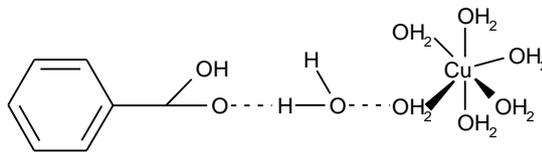


En la figura 37 se observa que del total de  $\text{Cu}^{2+}$  el 1 % corresponde al  $\text{Cu}^{2+}$  unido a los ácidos fúlvicos, es decir 0,24 ppm, siendo soluble pero no disponible para la planta puesto que está fuertemente quelatado, La unión del  $\text{Cu}^{2+}$  en la fracción de ácidos fúlvicos se debe en parte a la quelatación de este catión por estructuras de tipo carboxílico. Como se reportó anteriormente en la titulación de los ácidos fúlvicos con NaOH se obtienen valores de pKa en un rango de  $4.4 \pm 0.25$  correspondientes a ácidos de tipo carboxílico. En la figura 39 se muestra algunas interacciones del  $\text{Cu}^{2+}$  con los AF las cuales podrían ocurrir como: a) Formación de anillos quelatos, b) enlaces de hidrógeno y c) atracción electrostática debido a los grupos COOH.

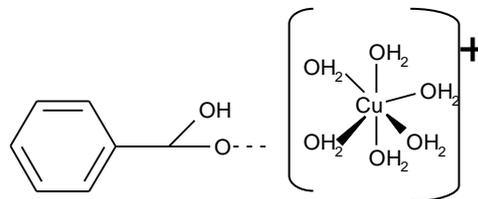
**Figura 39.** Estructura de un complejo  $\text{Cu}^{2+}$  - ácido fúlvico a) Formación de anillos quelatos, b) Como enlaces de hidrógeno y c) Atracción electrostática debido a los grupos  $\text{COOH}$ .



(a)



(b)



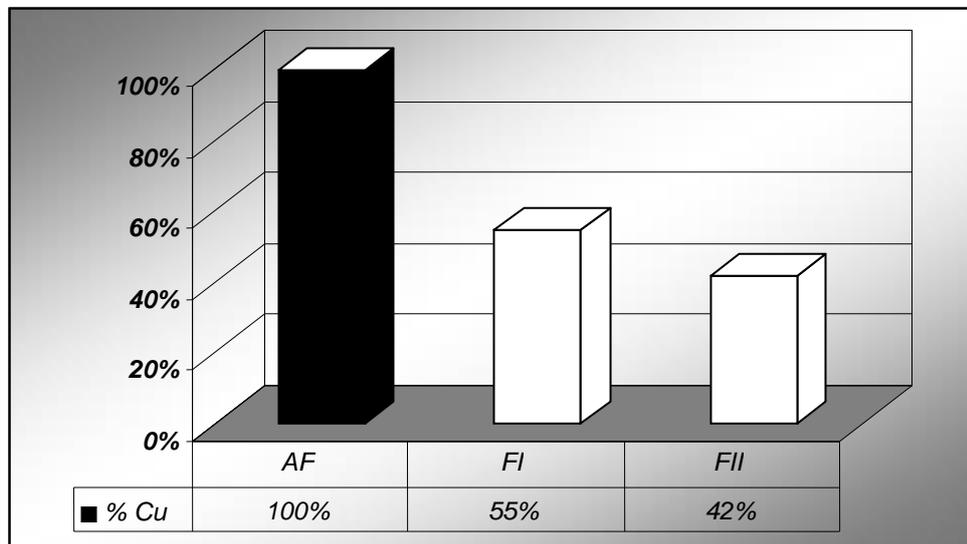
(c)

Cuando hay acumulación de M.O sin una adecuada humificación el contenido de ácidos fúlvicos se incrementa considerablemente y el porcentaje de  $\text{Cu}^{2+}$  unido a esta fracción puede ser lixiviado a los cuerpos de agua y causar allí contaminación.

Además se hizo la cuantificación del  $\text{Cu}^{2+}$  unido a las fracciones de ácidos fúlvicos separadas por el gel de sephadex; como se indica en la figura 40. En la

cual se observa que la fracción I que corresponde a la de mayor grado de condensación y de mayor peso molecular presenta mayor contenido de este metal siendo 1,3 veces superior a la del  $\text{Cu}^{2+}$  de la fracción II; indicando nuevamente que entre más grado de condensación presente la M.O, mayor será la posibilidad de complejar metales.

**Figura 40.-**Distribución del  $\text{Cu}^{2+}$  en las fracciones de ácidos fúlvicos purificados.



## 5. CONCLUSIONES

- El suelo utilizado para el estudio es muy fuertemente ácido, con alto nivel de materia orgánica, saturación media de aluminio y baja saturación de bases, presenta además fuerte deficiencia de fósforo y una textura franco arenosa.
- El método granulométrico fue efectivo para la separación de la materia orgánica humificada del suelo.
- Se logró la extracción de ácidos fúlvicos como una fracción de color pardo amarillo con solubilidad en medio alcalino y ácido, conductividad de 0,17 mS y un pH de 3,62; su parcial purificación dio como resultado una relación  $E_4/E_6$  de 10 característica de este tipo de sustancias provenientes del suelo.
- En las curvas de titulación se encontró que la acidez de los ácidos fúlvicos se debe principalmente a la presencia de grupos  $-COOH$ .
- La cromatografía de exclusión por tamaño, a través de sephadex G-75, de la fracción de ácidos fúlvicos, condujo a dos fracciones en donde, predomina la FII (62 %) con una relación  $E_4/E_6$  de 11,66 correspondiente a estructuras poco condensadas o con más estructuras alifáticas. Mientras que la FI con un porcentaje del 38 % presenta una relación  $E_4/E_6$  de 7,75 indicando mayor grado de condensación.
- Se estandarizó la técnica voltamperométrica para la determinación de  $Cu^{+2}$  en el suelo, ya que se obtuvieron óptimos coeficientes de correlación indicando una buena linealidad en el rango de concentraciones trabajadas, precisión del método y una sensibilidad adecuada para el análisis de  $Cu^{+2}$  en este tipo de fracciones.

- Se encontró que la mayor cantidad de  $\text{Cu}^{2+}$ , el 57 %, está presente en la fracción orgánica lo que muestra afinidad del catión con este tipo de sustancias. El 1 % de este metal está presente en los ácidos fúlvicos, indicando un riesgo potencial para la contaminación ambiental y una necesidad perentoria de manejo adecuado de este tipo de suelos para lograr una mayor humificación de su materia orgánica.
- El nivel de  $\text{Cu}^{2+}$  determinado en la muestra de suelo del Departamento del Cauca , Municipio de Cajibío, Vereda la Aurelia, es bajo, y se encuentra dentro de los valores establecidos para suelos colombianos como no tóxico para cultivos.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson P; Davidson C.M; Littlejohn D; Ore A.M; Garden L.M and Marshall J. 1998, Int. J. Environ. Anal Chem., 71, 19-40..
- Baes A. Y Bloom P. 1990. Soil Sci. Sol. Am. J.,54, 1248-1254.
- Bravo I., Giraldo E. 2003. Manual de prácticas de química agrícola: Análisis de suelos. Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Universidad del Cauca.
- Buol s., Hole F. y Cracken R. 1981. Génesis y clasificación de suelos. Capitulo 6.procesos edafológicos. Ed. Trillas. México. 111-124..
- Chubin R.G and Street J. 1981. J. Environ Quality, 10, 225-228.
- Dávila J.R. 2002. Caracterización preliminar de Ácidos Fúlvicos de dos suelos Colombianos (Andisol del Cauca y Oxisol del Amazonas). Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Departamento de Química, Popayán.
- Gamble D.S.; Schnitzer M.; and Hoffman I.1970. Can J. Chem, 48, 3, 197.
- Hayes M.; MacCarthy H.B.; Malcolm P.; Swift R.S. 1989.The search for structure: setting the scene, in Humic Substances II, Eds., Wiley, New York, Ch. 1; p 4-31.
- Kasatochkin, V., M. Kononova, N. Larina; O. Egorova. 1964. Trans. Int. Congr. Soil Sci. 8th Bucarest III, pp 81-86. In Schnitzer, M.; S.U. Khan. (eds.) 1978. Soil Organic Matter. New York, Elsevier Scientific Publishing Co. 319 p.
- Kononova M.,Belchikova N. 1961. Sov. Soil. Sci, 10, 75-87.
- Kononova, M. 1966. Soil organic matter. 2ª Ed. Pergamon Press, Oxford. p 404.
- Kot A; Namiesnik J. 2000. Trends Anal. Chem., 19, 69-79.
- Lund W. Fresenius.J.1990. Anal Chem, 337, 557-564.

- Malagón d., Pulido C., Llinas R., Chamorro C. 1995. Suelos de Colombia; Origen, evolución, clasificación, distribución, y uso. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Subdirección agrícola. p 75.
- McLean J.E., Bledsoe B.E.1992. Ground Water Issue, Behavior of metals in soil, EPA, 540. 5-92, 018.
- Morrison R., Boyd R. 1990. Química Orgánica 5ed. Mexico: Addison – Wesley Iberoamericana,. p 920-950.
- Muñoz B. 2004. Extracción y caracterización preliminar de huminas de un suelo andisol del departamento del Cauca. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Departamento de Química, Popayán.
- Muñoz G.M. 2003. Evaluación de la Retención de Aluminio por dos fuentes de Materia Orgánica y su correlación con el grado de Humificación. Universidad del Cauca, Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Departamento de Química, Popayán.
- Osterberg, R.; I. Lindqvist; K. Martensen.1993. Soil Sci. Soc. Am. J, 57, 283-285.
- Ouatmane, A. Dorazio V., Hafifi M. 2000. Agronomie, 20, 491-504.
- Petit M.D y Rucandio M.I. 1999. Anal. Chim Acta, 401, 283-291.
- Primavesi A. 1982. Manejo ecológico del suelo. Traducción de la quinta edición. Editorial el Ateneo, Costa Rica, p 95-111.
- RUIZ, B. y PEDRERO, P. 1994. Anal. Chem, 119,. 2377.
- RYLEY, T. y WATSON, A. 1987. Polarography and other voltammetric Methods. London: Acol, Thames Polytechnic. p. 159-193.
- Schnitzer M.1969. Soil Sci. Soc. Amer. Proc, 33, 75.
- Schnitzer, M. 1978. Humic substances: chemistry and reactions. In: Soil Organic Matter, Schnitzer, M.; Khan, S. U. Eds., Elsevier, Amsterdam, Ch. 1; p 1-64.
- Schulte E.E., Kelling K.A., Soil and applied Copper. Understanding plant Nutrients A 2527. Disponible en Internet: <http://cecommerce.uwex.edu/pdfs/A2527.PDF>.

- Simpson A.J.; Burdon J.; Raham C.L.2001. Eur. J. Soil Sci, 52, 495-509
- Skoog D.A.; West D.M.; y Holler F.J. 2003. Química Analítica. 7a Ed. México: McGraw-Hill.
- Stevenson F.J. 1985. Cycles of Soil. Carbon, Nitrogen, Phosphorus, Sulfur, Micronutrients. Department of Agronomy, University of Illinois. New York: A Wiley-Interscience publication.. p 17-99.
- Stevenson, F. J. 1982. Humus Chemistry. Genesis, Composition, Reactions. New York, John Wiley and Sons. p 443 .
- Tokalogiu S.; Kartal S.; and Birol G. 2003. Turk. J. Chem, 27, 333 – 346.
- Tsutsuki, K; S. Kuwatsuka. 1979. Soil Sci. Plant Nutr, 25, 365-371.

## 7. ANEXOS

### 7.1 Adición estándar

Es posible evitar la complicación que supone adaptar las matrices de los patrones a la de la muestra mediante la estandarización de esta última, a lo que se denomina método de adición estándar o patrón.

Para realizar una curva de calibración para el método de adición estándar se preparan una serie de muestras a las que se añaden cantidades crecientes del patrón. Se prepara así una curva de calibración en la que se representa la señal en función del volumen de patrón añadido o de la concentración tras su dilución. La figura 41 muestra dos ejemplos de curvas de calibración con adición de patrón según la ecuación 12. En la figura 41(a) se representa  $S_{fort}$  en relación con el volumen añadido de solución patrón,  $V_s$ . Cuando  $K$  es constante, la curva de calibración es lineal y resulta fácil demostrar que el valor absoluto de la abscisa en el origen es  $C_A V_o / C_s$ .

$$S_{fort} = K \left( \frac{V_o}{V_f} + C_s \frac{V_s}{V_f} \right)$$

**Ecuación 1**

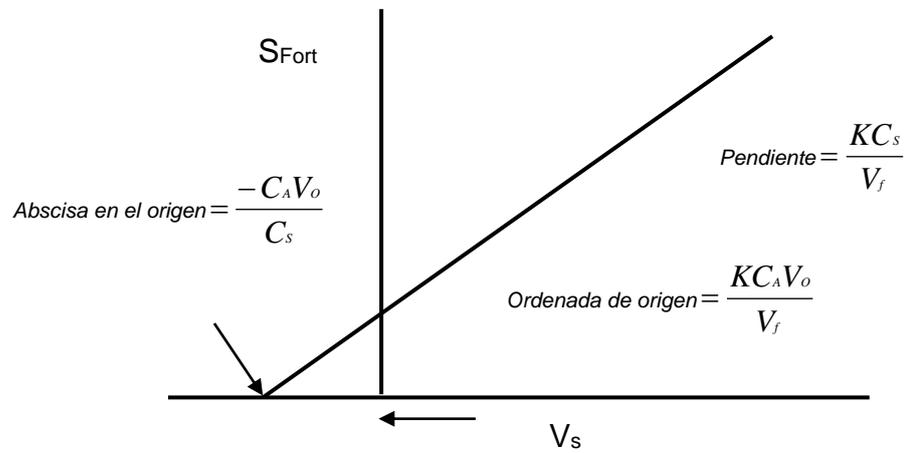
Dónde:  $S_{fort}$  = Señal medida

$V_o$  = Volumen de la muestra

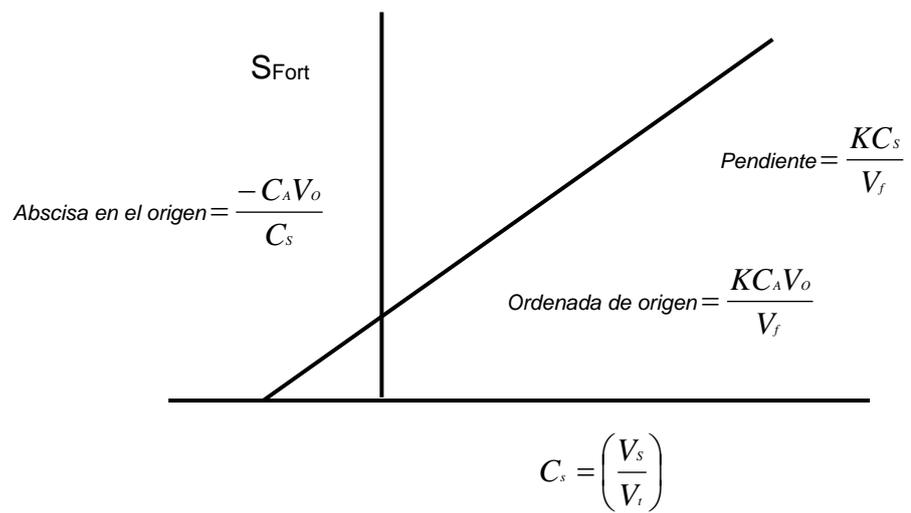
$V_f$  = Volumen final de la muestra

$V_s$  = Volumen del estándar

$K$  = pendiente



(a)



(b)

**Figura 41.** Ejemplos de curvas de calibración para el método de adición estándar. En (a) La señal se representa en función del volumen de patrón añadido y en (b) En función de la concentración del patrón añadido tras su dilución.

En la figura 41(b) muestra la relación cuando se representa  $S_{\text{fort}}$  en función de las concentraciones de los patrones agregados depuse de la dilución.

## 7.2 Estandarización del método

### 7.2.1. Linealidad

Para poder determinar la linealidad (dentro de un rango específico), se realizan una serie de diluciones a partir del patrón para obtener una grafica de la señal en función de la concentración del patrón después de la dilución, con ecuación lineal como se muestra a continuación

$$Y = a + bx \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde **b** es la pendiente y **a** el intercepto con el eje y. De esta manera se obtiene un coeficiente de correlación (r), el cual determina la linealidad de dicha curva.

### 7.2.2. Medidas de la tendencia central

- Media (x). es el promedio numérico obtenido al dividir la suma de todas todas la medidas individuales por el número de medidas.

$$X = \frac{\sum_{i=1}^n X_i}{n} \quad \text{Ecuación 3}$$

### 7.2.3. Medidas de dispersión

- Desviación estándar (s). Describe la dispersión de las mediciones individuales alrededor de la media y viene dada por la formula:

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - X)^2}{n - 1}} \quad \text{Ecuación 4}$$

A menudo, el valor que se informa es el de la desviación estándar relativa porcentual  $s_r$ .

$$s_r = \frac{S}{X} * 100\%$$

**Ecuación 5**

#### 7.2.4. Precisión

Por lo general, la precisión se divide en dos categorías: repetibilidad y reproducibilidad. La **repetibilidad** es la precisión obtenida cuando todas las mediciones son hechas por el mismo analista durante un solo periodo de trabajo analítico, utilizando las mismas soluciones y el mismo instrumental. A su vez, la **reproducibilidad** es la precisión obtenida en cualquier otro conjunto de condiciones, por ejemplo, por distintos analistas o en distintos días de trabajo de laboratorio por un mismo analista.

#### 7.2.5. Sensibilidad

La sensibilidad de un instrumento o de un método mide su capacidad de discriminar entre pequeñas diferencias en la concentración del analito, para lo cual se tiene que los parámetros para evaluar la sensibilidad del método son los límites de detección y cuantificación.

- Límite de detección (LD).

Es la concentración o peso mínimo de analito que puede detectarse para un nivel de confianza dado, proporcionando una señal significativamente diferente de la señal del blanco, lo cual se expresa matemáticamente como:

$$Y = y_B + 3S_B$$

**Ecuación 6**

Donde **y** es la señal analítica, **y<sub>B</sub>** es la señal medida del blanco (abscisa igual a cero) y **S<sub>B</sub>** es la desviación estándar del mismo.

- Límite de cuantificación (C)

Es la concentración o peso mínimo de analito más pequeño con la que pueden realizarse medidas cuantitativas, donde se tiene que

$$Y = y_B + 10S_B$$

**Ecuación 7**