

Metodología para obtener ácidos húmicos y fulvicos y su caracterización mediante espectrofotometría infrarroja*

Humic and fulvic acid extraction method and characterization by infrared spectrophotometry

Rubén López-Salazar¹, Guillermo González-Cervantes², Rigoberto Eustacio Vázquez-Alvarado^{1§}, Emilio Olivares-Sáenz³, Juan Antonio Vidales-Contreras³, Roberto Carranza de la Rosa³ y Manuel Ortega-Escobar⁴

¹Ciencias Agrícolas- Subdirección de Estudios de Posgrado. UANL. Marín, Nuevo León, México. (rlsmorris@hotmail.com; r_vazquez_alvarado@yahoo.com.mx). ²CENID-RASPA-INIFAP. Margen derecha Canal de Sacramento, km. 6.5, C. P. 35140, Gómez Palacio Durango. (gonzalez.guillermo@inifap.gob.mx). ³Facultad de Agronomía-UANL. Marín, Nuevo León, México. (emolivares@gmail.com; juan.vidalescn@uanl.edu.mx; carranzaroberto5@yahoo.com.mx). ⁴Colegio de Posgraduados. Carretera México-Texcoco km 36.5, Montecillo. 56230, Texcoco, Estado de México. (manueloe@colpos.mx). [§]Autor para correspondencia: r_vazquez_alvarado@yahoo.com.mx.

Resumen

Los extractos orgánicos en la actualidad tienen gran aceptación por los productores agrícolas fundamentalmente por su costo y al éxito de sus aplicaciones en los cultivos, con el fin de obtener un compuesto orgánico-mineral o humato como alternativa para eficientar los nutrientes a los cultivos, se recolectó un mineral fósil orgánico de una mina, en laboratorio se extrajeron las fracciones de ácido húmico (AH) y fúlvico (AF). Después se ajustó el pH de estos ácidos con fertilizantes químicos. Para los ácidos húmicos y fúlvicos se manejó un pH de 6, 7, 8 y 4, 6, 7 respectivamente y finalmente se solidificaron. Para la caracterización de los grupos funcionales de estos ácidos se utilizó un espectrómetro de luz infrarroja (IR). Los resultados muestran que ácidos húmicos y fúlvicos presentan grupos funcionales similares pero en cantidad diferente, la mezcla orgánico-mineral de AH y AF mostraron un comportamiento similar en adsorción del elemento incorporado, sin embargo el AH y AF ambos con pH 7 presentaron la mayor adsorción del Ca y Fe, esto se debe a que son compuestos pH dependientes y la capacidad de agrupamiento se debe a la reacción de intercambio catiónico dada por los radicales libres.

Palabras clave: extractos orgánicos, grupos funcionales, orgánico-mineral.

Abstract

Organic extracts are now widely accepted by farmers mainly because of cost and success of their applications in crops, in order to obtain an organic-mineral complex or humate as an alternative for efficient delivery of nutrients to crops, an organic fossil mineral was collected from a mine, humic acid (HA) and fulvic (FA) fractions were extracted in the laboratory. The pH of these acids was adjusted with chemical fertilizers. For humic and fulvic acids pH 6, 7, 8 and 4, 6, 7 was handled respectively and finally solidified. Functional groups of these acids were characterized by an infrared spectrometer (IR). Results show that humic and fulvic acids have similar functional groups but different amount, the organo-mineral mixture of HA and FA showed a similar behavior in adsorption of the added element, however both HA and FA at pH 7 showed the highest Ca and Fe adsorption, since they are pH dependent compounds and complex formation is due to the cation exchange reaction by free radicals.

Keywords: organic extracts, functional groups, organic-mineral.

* Recibido: enero de 2014
Aceptado: abril de 2014

Introducción

Los ecosistemas terrestres representan el carbono más interactivo (C). Hasta 67% de las 1 500 Gt de C orgánico del suelo están presentes entre 20 y 100 cm de profundidad, el C orgánico del suelo recibe el nombre de materia orgánica (MO), se compone de una mezcla heterogénea de compuestos orgánicos de diversos orígenes. En el subsuelo la MO se asocia principalmente con fases minerales y ambos forman agrupaciones orgánico-minerales, la formación de estos agrupamientos protege la MO de la degradación, sin embargo, los suelos no están hechos solo de minerales o sustancias orgánicas, estos dos componentes interactúan entre sí y por lo tanto controlan la química de la superficie del suelo; estas interacciones son importantes, pero en especial los suelos que reciben o acumulan grandes cantidades de sustancias orgánicas (Juneta *et al.*, 2013).

Las sustancias húmicas (SH) se componen de ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas residuales (HR), definidas como macromoléculas orgánicas, con una estructura química compleja, distinta y estable que provienen de la degradación de plantas y animales, por la actividad enzimática de microorganismos y metamorfismo orgánico (Schnitzer, 2000 y Sutton y Sposito, 2005), el término humus, se utilizó en la antigüedad para hacer referencia a la totalidad del suelo, posteriormente se ha empleado como sinónimo de MO, mientras que en la actualidad y como ya se ha mencionado, hace referencia a una fracción de dicha MO que engloba a un grupo de sustancias (Berthelin *et al.*, 2006), son la fracción orgánica del suelo más importante por su actividad en procesos físicos, químicos y biológicos en el suelo (MacCarthy, 2001), los AH son solubles en medios alcalinos, aunque no las condiciones de ácidos fuertes, si el $\text{pH} < 2$.

Los AF solubles en condiciones alcalinas y ácidas a diferencia de las huminas que son insolubles. La clasificación de las tres fracciones no representa tres tipos distintos de moléculas orgánicas (Hayes *et al.*, 1989), esto es debido al hecho de que las sustancias húmicas contienen diversos tipos de grupos funcionales cuyas capacidades de agrupamiento de metal varían considerablemente, pues suelen incluir un esqueleto de moléculas aromáticas alquilo con grupos funcionales, como ácidos carboxílicos, hidroxilo fenólico y grupos quinona unidos a ellos (Flores-Cespedes *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). La evidencia sugiere que la agrupación del metal con inorgánicos y ligandos orgánicos

Introduction

Terrestrial ecosystems represent the most interactive carbon (C). Up to 67% of the 1500 Gt of soil organic C is present between 20 and 100 cm deep, the soil organic C is called organic matter (OM), consists of a heterogeneous mixture of organic compounds of different origins. The subsoil OM is mostly associated with mineral phases forming organic-mineral complexes, which prevent MO degradation, however, the soils are not only made of mineral or organic substances, these two components interact with one another, therefore controlling the soil surface chemistry, these interactions are important, but especially soils receiving or accumulating large quantities of organic substances (Juneta *et al.*, 2013).

Humic substances (HS) comprise humic acids (HA), fulvic acids (FA) and residual humin (RH) defined as organic macromolecules, with a complex, distinct and stable chemical structure derived from plant and animal degradation by the enzymatic activity of microorganisms and organic metamorphism (Schnitzer, 2000 and Sutton and Sposito, 2005), the term humus, formerly used referring to the entire soil, has subsequently been used as OM synonym, while currently, and as already mentioned, refers to an OM fraction comprising a group of substances (Berthelin *et al.*, 2006), the most important organic fraction in soil based on its physical, chemical and biological activity (MacCarthy, 2001), The HA are soluble in alkaline media, but not in strong acid conditions ($\text{pH} < 2$).

The FA are soluble in alkaline and acidic conditions unlike humins which are insoluble. The classification in three fractions do not represent three different types of organic molecules (Hayes *et al.*, 1989), since humic substances contain various types of functional groups with different metal binding capacity since usually include an alkyl aromatic skeleton with functional groups like carboxylic acids, phenolic hydroxyls and quinone groups attached to them (Flores-Cespedes *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2009). The evidence suggests that metal complexation with inorganic and organic ligands in soil may influence metal mobility and bioavailability to soil organisms and plants.

en el suelo puede tener una influencia en la movilidad y la biodisponibilidad de los metales para los organismos del suelo y plantas.

Una alternativa para eficientar los nutrientes a los cultivos consiste en la combinación con compuestos inorgánicos, la aplicación de AH como una enmienda orgánica del suelo en combinación con otros materiales, resulta en un aumento significativo en el crecimiento de la planta y rendimiento de los cultivos, mediante la mejora de las propiedades hidrofísicas y disponibilidad de nutrientes de los suelos. Los complejos orgánico-minerales permiten a las plantas superar los efectos adversos de la salinidad del suelo, mejora la agregación, aireación, permeabilidad, capacidad de retención de agua, absorción de micronutrientes y disponibilidad y la disminución de la absorción de algunos elementos tóxicos (Ryabova, 2010).

Los métodos de espectroscopia cuantifican la composición química que forman las capas de los AH y AF, el método más acertado es el de infrarrojo cercano (Moros *et al.*, 2008). La espectroscopia infrarroja (IR) es de precisión y desarrollado en la actualidad para caracterizar las SH y sus fracciones: AH y AF. Los espectros IR de SH se caracterizan por su simplicidad, en la comparación con los espectros de la estructura definida de compuestos puros. Ésta sencillez resulta de la mezcla compleja de grupos funcionales que existen en una amplia variedad de ambientes químicos, cada uno caracterizado por constantes de fuerza diferente, lo que provoca un ensanchamiento de las bandas de IR (MacCarthy y Rice, 1985). La espectroscopia infrarroja proporciona información sobre los grupos funcionales contenidos en la estructura de los AH y AF (Gostishcheva *et al.*, 2009). El objetivo de este estudio es obtener y caracterizar un compuesto orgánico-mineral, húmico y fúlvico y caracterizar sus grupos funcionales mediante espectrofotometría infrarroja.

Materiales y métodos

Se utilizó un compuesto orgánico mineral de nombre leonardita obtenida de una mina ubicada a 29° 30' 22.18" latitud norte, 103° 33' 57.13" longitud oeste, a una altitud de 1 096 m, 96.5 km al norte de Presidio, Texas, EE.UU.

La leonardita recolectada se transportó al laboratorio donde fue molida y tamizada con una malla (1.0 mm diámetro), se pesaron 5 g de Leonardita, se colocó en un matraz de 250 ml y

An alternative for efficient nutrient delivery to crops consists of a combination with inorganic compounds, using HA as an organic amendment for soil in combination with other materials, resulting in a significant increase in plant growth and crop yield, by improving the hydrophysical properties and nutrient availability in soil. Organic-mineral complexes allow plants to overcome the adverse effects of salinity, improves soil aggregation, aeration, permeability, water holding capacity, micronutrient absorption and availability and decreased absorption of some toxic elements (Ryabova, 2010).

Spectroscopy methods quantify the chemical composition of the HA and FA layers, near infrared is the more accurate method (Moors *et al.*, 2008). Infrared spectroscopy (IR) is a precise technique developed to characterize HS and their fractions: HA and FA. The IR spectra of SH are simple, compared to the spectra of defined structure from pure compounds. This simplicity results from the complex mixture of functional groups present in a wide variety of chemical environments, each characterized by different force constants, which broaden the IR bands (MacCarthy and Rice, 1985). Infrared spectroscopy provides information on the functional groups contained in the HA and FA structure (Gostishcheva *et al.*, 2009). This study aims to extract and characterize an organo-mineral, humic and fulvic complex and characterize its functional groups by infrared spectrophotometry.

Materials and methods

An organic mineral compound called leonardite was used, which was obtained from a mine located at 29° 30' 22.18" North latitude, 103° 33' 57.13" West longitude, at a 1 096 m altitude, 96.5 km north from Presidio, Texas, U.S.

The harvested leonardite was transported to the laboratory where it was ground and sieved with a mesh (1.0 mm diameter), 5 g of leonardite were weighed, placed in a 250 ml flask and were added 100 ml of potassium hydroxide (1N KOH, pH 13.5), heated to 60 °C in a water bath for two hours and allowed to cool, 25 ml of solution were taken, weighed and the density was determined. Then the pH was adjusted to 4 with acetic acid (pH 2.4), calibrating the potentiometer with standard buffer solutions at pH 4, 7 and 10. The solution was heated to 70

se le adicionaron 100 ml de hidróxido de potasio (KOH y pH 13.5), 1N. Se coloca en "Baño María" a 60 °C durante dos horas y se deja enfriar. Se toman 25 ml de la solución, se pesan y se le determina la Densidad. Después, con ácido acético (pH 2.4), se le lleva el pH a 4; aquí, el potenciómetro deberá calibrarse con las soluciones Buffer de 4, 7 y 10, se calienta a 70 °C y se centrifuga a 8 000 rpm durante 30 min. Los ácidos húmicos precipitan; mientras que los ácidos fúlvicos permanecen en solución. La extracción de los AF se dio por la identificación del color amarillo a amarillo marrón remanente en la solución después de haberse extraído los AH debido a su acidificación.

Espectrómetro infrarrojo características y forma de uso

Los grupos funcionales se determinaron mediante la generación de espectrogramas utilizando un espectrofotómetro de luz infrarroja (Nicolet IR Series, FTIR Spectrometer, EE.UU). Después de haberse obtenido la muestra sólida de los compuestos se mezclaron con bromuro de potasio (KBr) en un mortero de ágata hasta obtener un polvo fino. La proporción de la muestra con respecto al KBr fue 1:100 (muestra/KBr) y una porción de estos compuestos por separado se colocó en un portador de muestra para preparar submuestras en pastillas empleando una prensa, la pastilla debe ser homogénea y fina, colocándola en una placa para muestras de acero para leerse en el IR. Debe evitarse la contaminación por polvo de la muestra y seguir las indicaciones sobre el uso de la prensa para hacer la pastilla (submuestras).

Las submuestras se colocaron en el espectrofotómetro y el análisis se hizo en la misma banda con 32 escaneos hasta obtener el mejor espectro que debe presentarse en la banda fina e intensa de acuerdo al porcentaje de su transmitancia. Las variables para obtener el mejor espectro se basan en la relación de muestra-solvente (KBr), valor de ganancia y la velocidad de la carta. Una vez obtenido el espectro óptimo para cada muestra se calibró la escala del espectro en el papel, obteniendo el número de ondas de los diferentes componentes.

Resultados y discusión

Medición de porcentaje y grupos funcionales para ácidos húmicos y ácidos fúlvicos

Se tomaron 50 ml de la solución y con ácido acético, mediante la reducción del pH hasta cuatro, se separaron los ácidos húmicos de los fúlvicos. Con la metodología de

°C and centrifuged at 8000 rpm for 30 min. Humic acids precipitate, while fulvic acids remain in solution. The FA extraction was identified based on the yellow to yellow-brown color remaining in solution after HA removal due to its acidification.

Infrared Spectrometer characteristics and how to use

The functional groups were determined by the generation of spectrograms using an IR spectrometer (Nicolet IR Series, FTIR Spectrometer, USA). The solid sample extracted from the compounds and mixed with potassium bromide (KBr) to a fine powder in an agate mortar. The sample: KBr ratio was 1:100 and a portion of these compounds was separated and placed on a sample holder to prepare subsamples as pellets using a press, the pellets should be homogeneous and thin, placed on a steel plate for samples to read in the IR. Sample contamination by dust must be avoided and instructions followed on how to use the press to make pellets (subsamples).

Subsamples were placed in the spectrometer and analyzed in the same band for 32 scans for the best spectrum which should be in the fine and intense band according to its transmittance percentage. The optimal spectrum is based on sample/solvent ratio (KBr), gain value and chart rate. Once the optimal spectrum for each sample was obtained, the spectrum scale was calibrated on paper, obtaining the wave number of the different components.

Results and discussion

Measurement of humic and fulvic acids percentage and functional groups

From the solution, 50 ml were taken, the pH adjusted to 4 with acetic acid, separating humic from fulvic acids. Percentages of humic and fulvic acids were measured by reverse titration with potassium permanganate (K_4MnO_7) (Table 1).

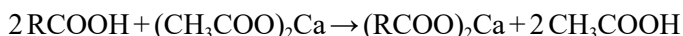
They were measured for the total acidity (TA), *i.e.*, the content of oxygenated functional groups, such as the carboxyls (-COOH) and hydroxyls (-OH), the methods described here are based on measurements of total and carboxylic acidity from Wright and Schnitzer (1959), and Schnitzer and Gupta (1965).

laboratorio de titulación a retroceso con permanganato de potasio (K₄MnO₇), se midieron los porcentajes de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos (Cuadro 1).

Les fueron medidos el contenido de acidez total (AT); es decir, el contenido de grupos funcionales oxigenados como los carboxilos (-COOH) y oxhidrilos (-OH), los procedimientos descritos aquí se basan en la medición de la acidez total y la acidez carboxílica de Wright y Schnitzer (1959), y Schnitzer y Gupta (1965).

Para la medición de la acidez total, la muestra se trata con una solución de hidróxido de bario en 2 N durante 24 h. El Ba (OH)₂ queda en la solución después de la reacción se valora con una solución de ácido estándar.

Para la valoración de los grupos carboxílicos, los materiales húmicos se agitan durante 24 h con una solución de acetato de calcio en exceso lo que provoca la liberación de ácido acético de acuerdo a una reacción del tipo:



El ácido acético se libera a continuación, se titula con una solución de bicarbonato estándar.

La proporción de los grupos fenólicos se calculó por la diferencia entre la acidez total y la acidez de los grupos carboxílicos.

De forma general, se puede establecer que los ácidos fúlvicos están más oxidados que los ácidos húmicos, por lo cual esto quiere decir, que los primeros están más polimerizados que los segundos. De forma particular, se puede comentar que los ácidos fúlvicos, son los más oxidados, porque son los que presentan el superior valor de acidez total.

Lo anterior, pone de manifiesto que los ácidos fúlvicos, contienen mayor número de cargas eléctricas negativas.

Cuadro 2. Acidez total (AT) y grupos funcionales carboxilo (-COOH) y oxhidrilos (-OH), de sustancias húmicas extraídas de leonardita.

Table 2. Total acidity (TA) and carboxyl (-COOH) and hydroxyls (-OH) functional groups of humic substances extracted from leonardite.

Tipo de sustancia húmica	AT (cmolc.kg ⁻¹)	-COOH (cmolc.kg ⁻¹)	-OH (cmolc.kg ⁻¹)
AH	200	10	190
AF	1 275	560	715

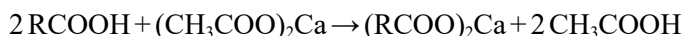
AH= ácido húmico; AF= ácido fúlvico.

Cuadro 1. Porcentaje de ácidos húmicos y fúlvicos.
Table 1. Percentage of humic and fulvic acids.

(%) AH	(%) AF
16	32

For total acidity measurement, the sample is treated with 2N barium hydroxide for 24 h. The Ba(OH)₂ remaining in solution after reaction, is titrated with a standard acid solution.

For carboxylic group titration, humic materials are stirred for 24 h with a calcium acetate solution in excess causing the release of acetic acid according to this type of reaction:



The acetic acid released is then titrated with a standard bicarbonate solution.

The proportion of phenolic groups was calculated by the difference between total and carboxylic acidity.

Generally, fulvic acids are more oxidized than humic ones, *i.e.* they are more polymerized. In particular, fulvic acids are the most oxidized, since they show higher value of total acidity.

The above indicates that fulvic acids contain more negative electric charges.

Canellas *et al.* (2008) defined the HS as relatively small supramolecular associations basically grouped by hydrophobic interactions and hydrogen bonds. Schulten and Schnitzer (1993) developed a two-dimensional (2D) molecule, the HA model structure with alkyl aromatic rings which play an important role. Oxygen is present as carboxyls, phenolic and alcoholic hydroxyls, esters and ketones, while nitrogen is produced in nitriles and

Canellas *et al.* (2008), definen las SH como asociaciones supramoleculares relativamente pequeñas, agrupadas básicamente por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno. Schulten y Schnitzer (1993) desarrollaron una molécula de dos dimensiones (2D) la estructura del modelo de AH en la que cuenta con anillos aromáticos alquilo desempeñan un papel importante. El oxígeno está presente en forma de carboxilos, hidroxilos fenólicos y alcohólicas, ésteres y cetonas, mientras que el nitrógeno se produce en nitrilos y estructuras heterocíclicas. El esqueleto de carbono resultante muestra microporosidad alta con huecos de varias dimensiones, que pueden atrapar y se unen otros elementos del suelo orgánicos e inorgánicos, así como el agua.

Obtención del humato de calcio y fulvato de hierro regulando las condiciones de pH de la solución

Siguiendo el criterio establecido por Iakimenko, 2005 y Rady, 2012, los que comentaron de acuerdo a sus investigaciones que un ácido húmico al cual se le puede incorporar un mineral, se le llama en éste caso humato de calcio y fulvato de hierro, donde la incorporación que se siguió en esta investigación de éstos minerales fue como sigue:

Humato de calcio: a 100 mL del AH el cual contaba con un pH original de 8, se le aplicó 125 g de $(\text{CaNO}_3)_2$ observándose un decremento en el pH el cual llegó a 7, posteriormente se aplicaron 20 g más para llegar a un total de 145 g de $(\text{CaNO}_3)_2$ y se observó nuevamente un decremento de pH el cual llegó finalmente a 6.

Fulvato de hierro: a 100 mL de AF el cual contaba con pH original de 4, se le adiciono 0.5 mL de KOH incrementándose el pH de la solución a 8, posteriormente se añadieron 10 g de FeSO_4 observando un decremento de pH hasta 7, después se añadió 1.75 g más y el pH disminuyo hasta 6.

Solidificación del ácido húmico, fúlvico, humatos de calcio y fulvatos de hierro

La solidificación se realizó mediante un rotovaporador (Yamato, Modelo SE 500, Japón), colocando 500 mL al ácido húmico (pH original 8), y sus fracciones elaboradas a pH 6 y 7, así mismo para el ácido fúlvico (pH original 4) y sus derivados a pH 6 y 7, dando un total de seis tratamientos, los cuales se depositaron en un matraz de 1 L, poniéndose bajo condiciones de baño maría a 60 °C, rotando a 80 rpm hasta eliminar el agua, este proceso de solidificación duró 8 h. El solvente no fue eliminado por completo por lo que se

heterocyclic structures. The resulting carbon skeleton exhibits high microporosity with pores of various sizes, which can trap and bind other organic and inorganic soil components, as well as water.

Calcium humate and iron fulvate extraction by regulating pH in the solution.

Following the criteria established by Iakimenko, 2005 and Rady, 2012, who comment that a humic acid binding a mineral, is called here calcium humate and iron fulvate where addition of these minerals in our study was as follows:

Calcium humate: to 100 mL of HA, originally at pH 8, 125 g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ were added, reaching pH 7 then 20 g were added *i.e.* overall 145 g of $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ reaching pH 6.

Iron fulvate: to 100 mL of FA originally at pH 4, 0.5 mL of KOH were added, increasing pH to 8, then 10 g of FeSO_4 were added, reaching pH 7, then 1.75 g more were added to a final pH 6.

Solidification of humic and fulvic acids, calcium humates and iron fulvates

The solidification was performed by a rotary evaporator (Yamato, SE 500 Model, Japan), placing 500 mL of humic acid (pH 8) and its fractions prepared at pH 6 and 7, also for fulvic acid (pH 4) and its derivatives at pH 6 and 7, overall six treatments, which were deposited in a 1 L flask, heated on water bath at 60 °C, rotating at 80 rpm until water is removed, the solidification required 8 h. The solvent was not completely removed so it was transferred to a porcelain dish and heated at 40 °C for 2 h on an electric grill to remove the remaining water and thereby obtaining the solid.

The Figure 1 shows the spectrogram of humic acid enriched with calcium nitrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) at pH 6, 7 and the original pH 8 after extraction.

The blue line represents the HA at pH 8 in which major signals or functional groups involved in ion exchange are noticeable: the -OH in the extractant or extraction vehicle appears in the 1 375 cm^{-1} band, NH amines or amides at 1 620 cm^{-1} , the -CH₃ and -CH₂ at 2 922 cm^{-1} and -OH free functional groups at 3 400 cm^{-1} , the HA at pH 7 and 6, red and green lines, respectively, show additional peaks after addition of the mineral element, thus the signal description is in greater proportion, favoring its description, differentiating

colocó en una cápsula de porcelana calentándola a 40 °C por 2 h en una parrilla eléctrica para eliminar el agua remanente y de ésta forma obtener el sólido.

El ácido húmico enriquecido con nitrato de calcio ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$) en los niveles de pH 6, 7 y el pH original de 8 después de su extracción se pueden observar en el espectrograma de la Figura 1.

La línea azul representa el AH con pH 8 en la cual se aprecian las señales o grupos funcionales que más participan en los procesos de intercambio iónico: el -OH del extractante o vehículo para extraer se presenta en la banda de 1 375 cm^{-1} , N-H aminas o amidas en 1 620 cm^{-1} , los - CH_3 y - CH_2 presentaron valores para de 2 922 cm^{-1} y grupos funcionales libres -OH en 3 400 cm^{-1} ; en el AH con pH 7 y 6, líneas roja y verde respectivamente, después de la incorporación del elemento mineral la aparición de otros picos se pueden apreciar, lo que significa que la descripción de la señal se encuentra en mayor proporción, facilitando su descripción, diferenciándose los picos por su pureza y concentración; el grupo funcional en el rango más bajo de la longitud de onda se encontró un grupo aromático-N-R esto representa una amina terciaria en la banda 760 y 631 cm^{-1} correspondiendo a los pH 7 y 6, los -OH secundarios para ambos AH en los dos pH se localizaron en las bandas 1 130 y 1 120 cm^{-1} , los grupos CH-OH, -OH del vehículo de extracción, se encontraron en la misma banda 1 390 cm^{-1} para las dos mezclas, las aminas o amidas N-H o con enlace carboxilos-C=O en 1 620 y 1 600 cm^{-1} , respectivamente, el - CH_3 presentó un valor similar de 1 930 cm^{-1} , el $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ se localizó en 2 870 y 2 840 cm^{-1} , de igual manera el -OH libre se presentó en la misma onda 3 390 cm^{-1} entre uno y otro compuesto orgánico-mineral.

El AH a un pH 6 muestra un mayor contenido de -OH secundarios seguido de AH a pH 7; sin embargo, en el AH a pH 7 los grupos N-H, C=O y -OH libre se presentan en mayor cantidad, esto indica menor absorción de la luz o mayor frecuencia individual de este tipo de compuestos en la mezcla mencionada, por lo que la absorción de $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ fue mayor en el AH a pH 7.

El espectrograma (Figura 2) del ácido fúlvico en su pH original, más los dos niveles que se generaron al mezclarlo con sulfato ferroso (FeSO_4) arrojó los siguientes resultados.

El AF a pH 4 (línea azul), representa el pH original al momento de la extracción, en este espectro, la lectura denota los siguientes grupos funcionales, con la mejor señal, el

peaks by purity and concentration, in the functional group at the lowest wavelength range an aromatic-N-R group was found, this represents a tertiary amine at the 760 and 631 cm^{-1} bands for pH 7 and 6, the secondary -OH for HA at both pH were found at 1 130 and 1 120 cm^{-1} , the CH-OH, -OH groups in the extraction vehicle were found at 1 390 cm^{-1} , amines or amides N-H or with carboxyl-C=O at 1 620 and 1 600 cm^{-1} , respectively, the - CH_3 showed a similar value of 1 930 cm^{-1} , the $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ was located at 2 870 and 2 840 cm^{-1} , the free -OH appeared at 3 390 cm^{-1} in both organic-mineral complexes.

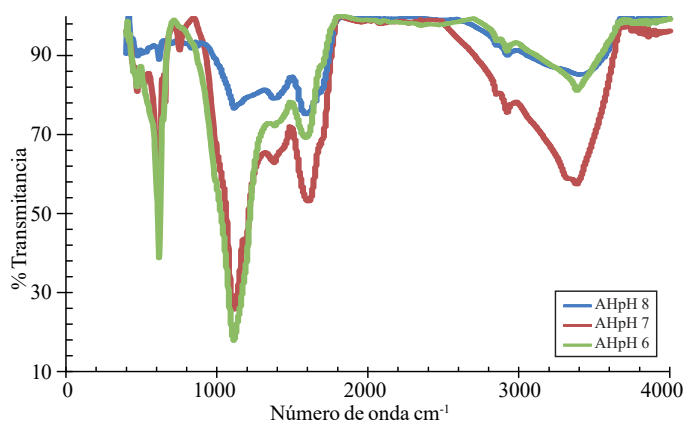


Figura 1. Espectro infrarrojo de ácidos húmicos enriquecidos con nitrato de calcio extraídos de leonardita.

Figure 1. Infrared spectra of humic acids enriched with calcium nitrate extracted from leonardite.

The HA at pH 6 shows a higher secondary -OH content followed by the HA at pH 7, however the latter shows more N-H, C=O and free -OH, this indicates less light absorption or higher individual frequency of this type of compounds, and thus higher $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ absorption in HA at pH 7.

The fulvic acid spectrogram (Figure 2) at the original pH, plus the two levels generated after mixing with ferrous sulfate (FeSO_4) yielded the following results.

The FA at pH 4 (blue line) represents the original pH at the time of extraction, in this spectrum, the reading shows the following functional groups, methylene - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ has the best signal at 1 162 cm^{-1} , for the -OH as extraction vehicle 1 439 cm^{-1} , N-H amines or amides group at 1 620 cm^{-1} and free -OH at 3 445 cm^{-1} , the FA at pH 7 and 6, red and green lines respectively, showed different peaks after mixing with FeSO_4 , for both pH the primary -OH is located at 1 050 cm^{-1} , just as the - $\text{CH}_2\text{-CH}_3$ at 1 360 cm^{-1} , the - $\text{CH}_2\text{-(C=O)-}$, - $\text{CH}_2\text{-(C}\equiv\text{N)}$ groups at 1 380 and 1 390 cm^{-1} respectively, for the extraction -OH 1 440 and 1 450 cm^{-1} , -N-H amines or

metileno-CH₂-CH₃ presento el valor de 1 162 cm⁻¹, para el -OH cuya función es ser el vehículo de extracción 1 439cm⁻¹, el grupo de N-H aminas o amidas 1 620cm⁻¹ y los -OH libres en 3 445cm⁻¹; el AF con pH 7 y 6, líneas roja y verde respectivamente, posteriormente mezclado el FeSO₄ diferentes picos se formaron, el AF en ambos pH el -OH primario se localiza en 1 050 cm⁻¹, de igual manera el -CH₂-CH₃ en 1 360 cm⁻¹, los grupos -CH₂-(C=O)-, -CH₂-(C≡N) en las bandas 1 380 y 1 390 cm⁻¹ respectivamente, para el -OH de extracción 1 440 y 1 450cm⁻¹, los grupos de -N-H-aminas o amidas en el 1 640 cm⁻¹ para ambas mezclas, un sobretodo provocado por un traslape de aminas o amidas-N-H- en la banda de 1 810 y 1 830 cm⁻¹ en los pH 6 y 7, el grupo -CH₃ en los dos pH se limita a la banda 1 860 cm⁻¹, de igual manera el -CH₂-CH₃ para los pH se encuentra en 2 930 cm⁻¹ y el -OH libre en AF a pH 6 en una lectura de 3 570 cm⁻¹ y AF a pH 7; 3 430 cm⁻¹. El AF a pH 6 y 7 muestran muchas similitudes, sin embargo, en el AF a pH 7 la frecuencia del grupo funcional libre (-OH) es mayor, por lo que la cantidad de adsorción de hierro también es mayor.

Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Chassapis *et al.* (2010), con respecto al uso de un espectro infrarrojo típico donde se demuestran las interacciones y diferencias existentes en las sustancias húmicas, absorción, adsorción o asociaciones de los diferentes grupos fenólicos de importancia que se encuentran distribuidos en las regiones 1 050, 1 650 y 3 400 cm⁻¹, esto coincide con lo expuesto por Sivakova *et al.* (2010) en los espectros de IR mostraron una serie de bandas de absorción características de los ácidos húmicos. La presencia de grupos carboxilos y carbonilos (1 720-2 700 cm⁻¹), grupos hidroxilos (3 400-1 256 cm⁻¹), éter-oxígeno (1 650 cm⁻¹), -CH₃-CH₂ (2 930 cm⁻¹).

También se observa que las propiedades fisicoquímicas de las sustancias húmicas varían según su origen (Fukushima *et al.*, 2006), son biopolímeros multifuncionales amorfos, compuestos por cientos de componentes orgánicos que incluyen carbohidratos y anillos aromáticos condensados, que pueden ser sustituidos por grupos fenólicos, carboxilos, oxhidrilos y metilos, donde estos resultados concuerdan con los obtenidos por Peuravuori *et al.* (2006) y Evangelou *et al.* (1999). Éstos grupos tienen la particularidad de agrupar y quelatar cationes en la solución del suelo, llevarlos a la pared celular de la raíz, similar a agentes quelatantes y ser transportados los nutrientes por el torrente xilemático hacia los puntos de crecimiento.

amides at 1640 cm⁻¹ for both mixtures, an overtone caused by an -NH- amines or amides overlap at 1 810 and 1 830 cm⁻¹ for pH 6 and 7, the -CH₃ group is at 1 860 cm⁻¹ for both pH, just as the -CH₂-CH₃ for both pH is at 2 930 cm⁻¹, and free -OH at 3 570 cm⁻¹ and 3 430 cm⁻¹ for pH 6 and 7 respectively. The FA at pH 6 and 7 show many similarities, however FA at pH 7 shows higher frequency for the (-OH) free functional group and thus higher iron adsorption.

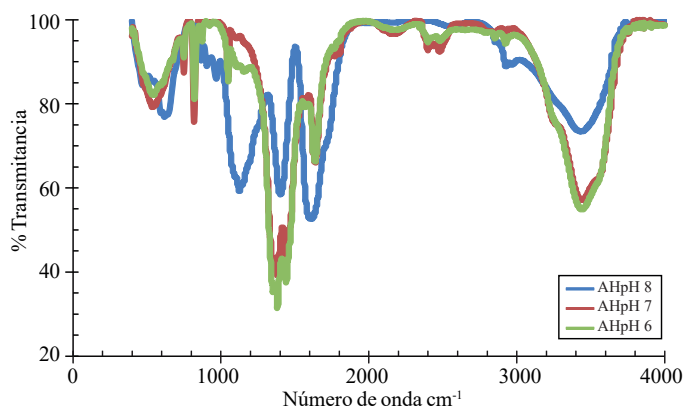


Figura 2. Espectro infrarrojo de ácidos fúlvicos enriquecidos con sulfato ferroso extraídos de Leonardita.

Figure 2. Infrared spectra of fulvic acids enriched with ferrous sulfate extracted from Leonardite.

These results agree with those obtained by Chassapis *et al.* (2010), regarding the use of a typical infrared spectrum showing interactions and differences in humic substances, absorption, adsorption, or associations of different relevant phenolic groups distributed in the regions 1 050, 1 650 and 3 400 cm⁻¹, this coincides with Sivakova *et al.* (2010) who showed IR spectra with characteristic absorption bands for humic acids due to the presence of carboxyl and carbonyl groups (1 720-2 700 cm⁻¹), hydroxyl groups (3 400-1 256 cm⁻¹), oxygen-ether (1650 cm⁻¹), -CH₃-CH₂ (2 930 cm⁻¹).

It is also noted that the physicochemical properties of humic substances vary according to their origin (Fukushima *et al.*, 2006), they are amorphous multifunctional biopolymers, comprising hundreds of organic compounds including carbohydrates and condensed aromatic rings, which may be substituted by phenol groups, carboxyls, hydroxyls and methyls, and these results are consistent with those obtained by Peuravuori *et al.* (2006) and Evangelou *et al.* (1999). These groups act like chelating agents by complexing and chelating cations in the soil solution, transferring them to the root cell wall, then these nutrients are translocated by the xylem stream to the growing points.

El enlace metal-ion (Ca o Fe) se ha demostrado que varía con la concentración de soluto de cationes, el pH, tipo de mineral y enlace (Puls and Bohn, 1988), los complejos orgánico-minerales permiten a las plantas superar los efectos adversos de la salinidad del suelo, mejora la agregación, aireación, permeabilidad, capacidad de retención de agua, absorción de micronutrientes y disponibilidad, y la disminución de la absorción de algunos elementos tóxicos (Ryabova, 2010). Los resultados obtenidos por muchos autores sugieren que la cantidad y la fuerza de agrupamiento de iones no parecen estar relacionados con el peso atómico, número atómico, radio iónico, o el radio hidratado del metal retenido, esto es debido al hecho de que las sustancias húmicas contiene diversos tipos de grupos funcionales cuyas capacidades de agrupamiento de iones varían considerablemente.

Una forma prometedora para mejorar la calidad de las sustancias húmicas consiste en su combinación con productos inorgánicos, esto hace que sea posible conferir resistencia mecánica y resistencia a la hidrólisis ácida y alcalina para los compuestos húmicos y mejorar sus propiedades de sorción. Es un procedimiento accesible y barato para ser utilizado en el desarrollo de adsorbentes orgánico-minerales porque dichas materias primas son abundantes, baratos, y capaz de ser modificado químicamente.

Conclusiones

El uso de la espectro fotometría infrarroja permitió caracterizar los grupos funcionales de las sustancias húmicas y su comparación.

La concentración total del elemento químico y el pH de la sustancia húmica, son los dos factores más determinantes en la interacción compuesto húmico-elemento químico. Los ácidos húmicos y los ácidos fúlvicos, son más oxidados y por lo tanto, poseen mayor capacidad de agrupar cationes.

Los ácidos fúlvicos pueden ser considerados como asociaciones de pequeñas moléculas hidrofílicas en los que hay grupos funcionales ácidos suficiente para mantener los grupos fúlvicos dispersos en la solución a cualquier pH. Los ácidos húmicos son hechos por las asociaciones de compuestos predominantemente hidrofóbica (cadenas polimetilénica, ácidos grasos, compuestos esteroides), que se estabilizan a un pH neutro por fuerzas hidrofóbicas de dispersión. Sus conformaciones crecen progresivamente

The metal-ion bond (Ca and Fe) has been shown to vary with the solute concentration of cations, pH, mineral and bond type (Puls and Bohn, 1988). Organo-mineral complexes allow plants to overcome adverse effects of salinity, improve soil aggregation, aeration, permeability, water holding capacity, micronutrients absorption, and decreased absorption of some toxic elements (Ryabova, 2010). Results from many authors suggest that the number and strength of ion groups are not related to atomic weight, atomic number, ionic radius, or hydrated radius of retained metal, since humic substances contain different types of functional groups with a wide range of ion complexing capacities.

One promising way to improve the quality of humic substances is their combination with inorganic products, conferring mechanical strength and resistance to acid and alkaline hydrolysis and improved sorption properties. This is a low-cost and accessible procedure to develop organic-mineral adsorbents since these raw materials are abundant, cheap, and can be chemically modified.

Conclusions

Using infrared spectrophotometry allowed us to characterize the functional groups of humic substances and their comparison.

Overall concentration of the chemical element, and the pH of humic substances, are the two major factors in the humic compound-chemical element interaction. Humic and fulvic acids, are more oxidized and thus have greater cation binding capacity.

Fulvic acids can be considered as associations of small hydrophilic molecules with acid functional groups sufficient to keep fulvic groups dispersed in solution at any pH. Humic acids are associations of predominantly hydrophobic compounds (polymethylene chains, fatty acids, steroid compounds), which are stabilized at a neutral pH by dispersion hydrophobic forces. Their conformations grow progressively as their intermolecular hydrogen bonds are formed at increasingly lower pH, until flocculation. Spaccini *et al.* (2008) suggested that, based on the concept of supramolecular association, the classical definitions of humic and fulvic acids should be reconsidered.

cuando sus vínculos intermoleculares de hidrógeno son cada vez más formada en valores de pH más bajos, hasta flocular. Spaccini *et al.* (2008) propone que, basándose en el concepto de asociación supramolecular, las definiciones clásicas de los ácidos húmicos y fúlvicos debe ser reconsiderada.

Los ácidos húmicos y fúlvicos extraídos de leonardita muestran una alta capacidad de adsorción debido a carboxilos, oxhidrilos, fenoles, aminas, amidas y metilos, donde los oxhidrilos presentan la mayor proporción de intercambio con Ca y Fe.

Los radicales libres de oxhidrilos se detectan en los intervalos altos de número de onda, diferenciándose de los oxhidrilos provenientes del vehículo de extracción (KOH) porque este produce intervalos bajos de número de onda.

La elaboración de las agrupaciones orgánico-minerales fue afectado por el manejo del pH, siendo afectada la mezcla final por el tipo de elemento que se incorpora, ya sean estos de una reacción ácida o alcalina.

Independientemente de la reacción original del ácido húmico (pH 8) y fúlvico (pH 4) al modificarse estas a pH 7, se tuvo la absorbancia de luz menor del infrarrojo indicándonos una mayor presencia de Ca y Fe.

Literatura citada

- Berthelin, J.; Babel, U. and Toutain, F. 2006. History of soil biology. *In*: Warkentin, B. P. (Ed.), *Footprints in the Soil. People and ideas in soil history*. Elsevier, Amsterdam. 279-306 pp.
- Canellas, L. P.; Teixeira-Junior, L. R. L.; Dobbss, L. B.; Silva, C. A.; Médici, L. O.; Zandonadi, D. B. and Façanha, R. A. 2008. Humic acids crossinteractions with root and organic acids. *Ann. Appl. Biol.* 153:157-166.
- Chassapis, K.; Maria, R.; Vrettou, E. and Parassiris, A. 2010. Preparation of bioinorganic fertilizing media by adsorption of humates on lassy aluminosilicates. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 81:115-122.
- Chen, H.; Berndtsson, R.; Ma, M. and Zhu, K. 2009. Characterization of insolubilized humic acid and its sorption behaviors. *Environ. Geol.* 57:1847-1853.
- Evangelou, V. P.; Marsi, M. and Vandiviere, M. M. 1999. Stability of Ca^{2+} -, Cd^{2+} -, Cu^{2+} -[illite-humic] complexes and pH influence. *Plant Soil* 213:63-74.
- Flores-Céspedes, F.; Fernández-Pérez, M.; Villafranca-Sánchez, M. and González-Pradas E. 2006. Cosorption study of organic pollutants and dissolved organic matter in a soil. *Environ. Pollut* 142:449-456.
- Humic and fulvic acids extracted from leonardite show a high adsorption capacity due to carboxyls, hydroxyls, phenols, amines, amides and methyls, where hydroxyls show the highest Ca and Fe exchange rate.
- Hydroxyl free radicals are detected at high wavenumber intervals, differing from the hydroxyls in the extraction vehicle (KOH) which produce low wavenumber intervals.
- The development of organic-mineral complexes was affected by pH management, the final mixture being affected by the type of element added, either from an acid or alkaline reaction.
- Regardless of the original reaction of humic (pH 8) and fulvic (pH 4) acids, after modifying these to pH 7, lower infrared light absorbance was obtained, indicating greater Ca and Fe levels.

End of the English version



- Fukushima, M. and Tatsumi, K. 2006. Complex formation of water-soluble iron (III)-porphyrin with humic acids and their effects on the catalytic oxidation of pentachlorophenol. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 245:178-184.
- Gostishcheva, M. V.; Belousov, M. V.; Yusubov, M. S.; Ismatova, R. R. and Dmitruk, S. E. 2009. Comparative IR spectral characteristics of humic acids from peats of different origin in the Tomsk area. *43(7):44-47.*
- Hayes, M. H. B.; MacCarthy, P.; Malcolm, R. L. and Swift, R. S. 1989. The search for structure: setting the scene. *In* humic substances II: in search of structure. (Eds.) Wiley New York. 3-31 pp.
- Iakimenko, O. S. 2005. Use of Humic Substances to remediate polluted environments: from theory to practice, Springer. Printed in the Netherlands. 365-378.
- Juneta, A.; Isabelle, B. D.; Daniel, B.; Armand, M.; Samuel, L.; Christine, M.; Jerome, B.; Joelle, T. and Sylvie, D. 2013. Characterisation of organic matter from organo-mineral complexes in an Andosol from Reunion Island. *J. Anal. Appl. Pyrol.* 99:92-100.
- Maccarthy, P. 2001. The principles of humic substances. *Soil Sci.* 166:738-751.
- MacCarthy, P. and Rice, J. A. 1985. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. *Wiley-Interscience, New York.* 527- 559 pp.
- Moros, J.; Herbello-Hermelo, P.; Moreda-Piñeiro, A.; Bermejo-Barrera, P.; Garrigues, S. and de la Guardia, M. 2008. Screening of humic and fulvic acids in estuarine sediments by near-infrared spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 392:541-549.
- Rady, M. M. 2012. A novel organo-mineral fertilizer can mitigate salinity stress effects for tomato production on reclaimed saline soil. *South Afr. J. Bot.* 81:8-14.
- Ryabova, I. N. 2010. Organomineral sorbent from shubarkol coal. *Solid Fuel Chem.* 44(5):335-338.

- Peuravuori, J.; Zbankova P. and Pihlaja, K. 2006. Aspects of structural features in lignite and lignite humic acids. *Fuel Process Technol.* 87:829-839.
- Puls, R. W. and Bohn, H. L. 1988. Sorption of cadmium, nickel, and zinc by kaolinite and montmorillonite suspension. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 52:1289-1292.
- Schnitzer, M. 2000. Life time perspective on the chemistry of soil organic matter. Sparks, D. L. (Ed.). *Advances in Agronomy*, Academic Press. 98:3-58.
- Schnitzer, M. and Gupta, U. C. 1965. Determination of acidity in soil organic matter. *Soil Sci. Soc. Am. Proc.* 29:274-277.
- Schulten, H-R. and Schnitzer, M. 1993. A state of the art structural concept of humic substances. *Naturwissenschaften.* 80:29-3.
- Sivakova, L. G.; Lesnikova, N. P.; Kim, N. M. and Rotova, G. M. 2010. Physicochemical properties of the humic substances of peat and brown coal. *Solid Fuel Chem.* 45(1):1-6.
- Sutton, R. y Sposito, G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39(23):9009-9015.
- Wright, J. R. and Schnitzer, M. 1959. Oxygen-containing functional groups in the organic matter of a Podzol soil. *Nature, London.* 184:1462-1463.