



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

TESIS DE DOCTOR EN QUIMICA

Estudios de adsorción y agregación de ácidos húmicos con
minerales constituyentes del suelo en presencia de iones
calcio.

Nanci S. Kloster

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2015

PREFACIO

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Química, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Química durante el período comprendido entre el 7 de septiembre de 2010 y el 4 de agosto de 2015, bajo la dirección del Dr. Marcelo Avena.

Lic. Nanci Kloster



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el .../.../..... , mereciendo la calificación de(.....)

RESUMEN

Los microagregados de tamaño arcilla ($< 2\mu\text{m}$) y limo ($2\text{-}50\mu\text{m}$), que se generan por la interacción de la fracción mineral y el material orgánico, son la unidad básica de estructura en el suelo, y constituyentes de sedimentos y aguas. Las características de los microagregados son de gran importancia desde el punto de vista medioambiental en lo que respecta a procesos tales como erosión, transporte de partículas, formación de sedimentos, movilización de nutrientes y pesticidas y estabilización química de la materia orgánica. En esta tesis se estudia la interacción de los ácidos húmicos (AH), que forman parte importante de la materia orgánica, con la fracción mineral de tamaño arcilla ($<2\mu\text{m}$), ambos extraídos de un mismo suelo de la Región Semiárida Pampeana Argentina.

Luego del capítulo 1 a modo introductorio, los capítulos 2 y 3 describen los procedimientos de extracción y caracterización del AH y de la fracción arcilla del suelo. Se aplican diversos métodos de caracterización para determinar la composición elemental, los grupos funcionales, las propiedades de carga y el tamaño de ambas fracciones.

En el capítulo 4 se realiza un estudio cinético de agregación del AH evaluando el efecto del calcio a diferentes pH. Se utiliza espectroscopia UV-visible para determinar la fracción de AH agregado en función del tiempo y medidas de potencial zeta para determinar las propiedades de carga de las moléculas. Se propone un mecanismo de agregación de dos etapas, una unión rápida del calcio al AH y una formación lenta de agregados de moléculas AH-calcio. Se determina la concentración de coagulación crítica (CCC) de calcio para el AH en un valor $1\pm 0,2\text{ mM}$.

En el capítulo 5 se estudia la adsorción/agregación del AH a la fracción arcilla del suelo, en presencia de calcio. Se cuantifica el AH y el calcio en solución luego de la adsorción por UV-visible y electrodo selectivo de iones calcio respectivamente. Se determina que bajas concentraciones de iones calcio favorecen la adsorción, mientras que altas concentraciones inducen la agregación del AH. Se propone el uso de gráficos novedosos para detectar el proceso de agregación. Se determina la CCC de iones calcio para el AH en presencia de la fracción arcilla en un valor $0,7\text{ mM}$. El valor levemente inferior a la CCC del AH en ausencia de partículas sólidas, ocurre porque la superficie sólida actúa como centro de nucleación, favoreciendo la agregación.

Finalmente en el capítulo 6 se analiza la cinética de sedimentación de la fracción arcilla del suelo, en presencia de iones sodio y calcio y AH. La sedimentación se monitorea empleando espectroscopia visible, una técnica fácilmente accesible en laboratorios de la especialidad. También se evalúa el tamaño de los agregados formados mediante Dispersión de luz dinámica. A partir de los datos cinéticos se construyen curvas de estabilidad de la fracción arcilla y se determina la CCC de sodio y calcio. No se observa efecto de la presencia de AH sobre la CCC de iones calcio.

ABSTRACT

Microaggregates of clay (<2 μ m) and silt (2-50 μ m) size are generated by the interaction of the mineral fraction and the organic material and they are the basic unit of the soil structure, and sediment and water constituents. Microaggregates are of great importance from an environmental point of view with regard to processes such as erosion, particle transport, sediment formation, mobilization of nutrients and pesticides and chemical stabilization of organic matter. In this thesis the interaction of humic acids (HA), which are an important part of organic matter with the mineral clay size fraction (<2 μ m), both taken from the same soil in the Semiarid Pampa Argentina Region is studied.

Chapter 1 is introductory and background information is given. Chapters 2 and 3 describe the extraction and characterization of AH and clay soil fraction. Some characterization methods are applied to determine the elemental composition, the functional groups, the zeta potential and the size of both fractions.

Chapter 4 shows a kinetic study of aggregation of AH by evaluating the effect of calcium at different pH. UV-visible spectroscopy is used to determine the fraction of HA aggregated as a function of time and zeta potential measurements are used for determining charge properties of the molecules. A mechanism for aggregation of two steps is proposed, fast attachment of calcium to AH and a slow formation of aggregates of molecules AH-calcium. The critical coagulation concentration (CCC) for calcium is 1 + 0.2 mM.

Chapter 5 presents the adsorption and aggregation of AH to clay soil fraction studied in the presence of calcium by adsorption isotherms. HA and calcium in solution after aggregation are quantified by UV-visible and calcium-selective electrode respectively. It is determined that low calcium concentrations favor adsorption, while high concentrations induce aggregation of HA. The use of novel graphics intends to detect the aggregation process. Calcium CCC for AH is determined in the presence of the clay fraction at 0.7 mM. The CCC slightly lower than the CCC obtained in chapter 4 for AH in the absence of solid particles, takes place because the solid surface acts as a nucleation center, favoring aggregation.

Chapter 6 shows deposition kinetics of clay soil fraction analyzed in the presence of sodium and calcium ions and AH. Sedimentation is monitored using visible spectroscopy, an easily accessible technique in laboratories. The size of the aggregates is also evaluated by Dynamic light scattering. From the kinetic data are constructed stability curves for clay fraction and CCC for sodium and calcium are determined. No effect of the presence of HA on CCC calcium was observed.

ÍNDICE

Capítulo 1. Introducción General	1
1.1. Antecedentes.....	2
1.2. El suelo.....	3
1.3. La materia orgánica.....	5
1.4. Estudios de adsorción / agregación de SH en suelos	7
1.5. Estudios cinéticos de agregación / sedimentación de SH y minerales	9
1.6. Objetivo y Diagramación de la tesis.....	9
1.7. Bibliografía	11
Capítulo 2. Extracción y Caracterización del Ácido Húmico del Suelo	14
2.1 Introducción.....	15
2.2. Materiales y métodos	17
2.2.1. Muestreo y análisis de suelo.....	17
2.2.2. Extracción de AH	18
2.2.3. Análisis elemental.....	20
2.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido.....	21
2.2.5. Espectroscopia UV-visible	21
2.2.6. Espectroscopia Infrarroja	21
2.2.7. Medidas de potencial zeta (ζ).....	21
2.2.8. Isotermas de adsorción de calcio.....	22
2.3. Resultados y discusión.....	22
2.3.1. Caracterización físico-química del suelo.....	22
2.3.2. Análisis elemental del AH	23
2.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido.....	25
2.3.3 Espectroscopia UV-visible	27
2.3.4 Espectroscopia Infrarroja	30
2.3.5 Medidas de potencial zeta (ζ).....	31
2.3.6. Isotermas de adsorción de calcio al AH	32
2.4. Conclusiones.....	35
2.5. Bibliografía	36
Capítulo 3. Extracción y Caracterización de la Fracción Arcilla del Suelo	40
3.1. Introducción.....	41
3.1.1. Filosilicatos.....	41
3.1.2. Óxidos.	47
3.2. Materiales y métodos	48
3.2.1. Extracción de la fracción arcilla.....	48

3.2.2. Capacidad de intercambio catiónico.....	49
3.2.3. Difracción de rayos X.....	49
3.2.4. Espectroscopia Infrarroja	49
3.2.5. Composición elemental. Espectroscopia por fluorescencia de rayos X.....	49
3.2.6. Tamaño de las partículas en estado sólido. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	49
3.2.7. Tamaño de las partículas en suspensión. Dispersión de luz dinámica	50
3.2.8. Medidas de potencial zeta (ζ).....	50
3.3. Resultados y discusión.....	51
3.3.1. Capacidad de intercambio catiónico	51
3.3.2. Difracción de rayos X.....	51
3.3.3. Espectroscopia Infrarroja	52
3.3.4. Composición elemental. Espectroscopia por fluorescencia de rayos X.....	54
3.3.5. Tamaño de las partículas en estado sólido. Microscopía electrónica de barrido (SEM)	56
3.3.6. Tamaño de las partículas en suspensión. Dispersión de luz dinámica	57
3.3.7. Medidas de potencial zeta	58
3.4. Conclusiones.....	59
3.5. Bibliografía	61
Capítulo 4. Cinética de Agregación del Ácido Húmico: Efecto del pH y de Iones Calcio	63
4.1. Introducción.....	64
4.2. Materiales y Métodos	66
4.2.1. Medidas de potencial zeta (ζ).....	66
4.2.2. Experimentos de cinética de agregación.....	67
4.2.3. Microscopía óptica	68
4.3. Resultados y Discusión	68
4.4. Conclusiones.....	81
4.5. Bibliografía	82
Capítulo 5. Interacción del Ácido Húmico y la Fracción Arcilla: Adsorción y Agregación Superficial.....	85
5.1. Introducción.....	86
5.2. Materiales y Métodos	88
5.2.1. Medidas de potencial zeta (ζ).....	88
5.2.2. Isotermas de adsorción.....	89
5.2.3. Microscopía óptica	91
5.3. Resultados y Discusión	91

5.4. Conclusiones.....	103
5.5. Bibliografía	105
5.6. Anexo.....	108
Capítulo 6. Estudio de Agregación / Sedimentación de la Fracción Arcilla del Suelo	112
6.1. Introducción.....	113
6.2. Teoría.....	115
6.3. Materiales y Métodos.....	119
6.3.1. Fracción arcilla y AH.....	119
6.3.2. Estudios de agregación y sedimentación empleando espectrofotometría UV-visible	119
6.3.3. Evaluación del tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica...	120
6.4. Resultados y Discusión	120
6.5. Conclusiones	132
6.6. Bibliografía	133
Capítulo 7. Conclusiones Finales.....	136

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Fases del sistema suelo.....	4
Figura 1.2. Principales flujos de carbono en el sistema suelo-planta-atmósfera.....	6
Figura 2.1. Croquis de ubicación del sitio de muestreo de suelo.....	18
Figura 2.2. Esquema general de las etapas del procedimiento de extracción y purificación del AH.....	20
Figura 2.3. Micrografía SEM de las partículas de AH.	26
Figura 2.4. Espectro EDAX de partículas de AH, observadas en la Figura 2.3c....	27
Figura 2.5. Espectro UV-visible de la muestra de AH.....	28
Figura 2.6. Espectro IR obtenido para la muestra de AH.....	31
Figura 2.7. Efecto del pH sobre el potencial zeta del AH en NaCl y en CaCl ₂	32
Figura 2.8. Curva de calibración del electrodo de ion selectivo para calcio.....	33
Figura 2.9. a) Isotermas de adsorción de calcio a AH a pH 5, 7 y 9. b) Representación logarítmica de las isotermas de adsorción mostradas en la Figura a).....	34
Figura 3.1. A: a) tetraedro de silicio simple, b) tetraedros unidos formando la capa tetraédrica. B: a) octaedro de aluminio simple, b) octaedros unidos formando la capa octaédrica.....	42
Figura 3.2. a) estructura de una lámina 1:1, b) estructura de una lámina 2:1.....	43
Figura 3.3. Esquema de la estructura de la montmorillonita.....	45
Figura 3.4. Esquema de la estructura de la illita.....	46
Figura 3.5. Esquema de la estructura de la caolinita.....	47
Figura 3.6. Difractograma de la fracción arcilla extraída de suelo.....	52
Figura 3.7. Espectro IR de la fracción arcilla estudiada.....	53
Figura 3.8. a) Micrografía SEM de la muestra de fracción arcilla. b) Espectro EDAX correspondiente a las partículas de fracción arcilla de la Figura 3.8a.....	56
Figura 3.9. Distribución de tamaño de partículas determinada por dispersión de luz dinámica en NaCl 0,5 M para 3 concentraciones de suspensión arcilla: 0,025, 0,05 y 0,10 g L ⁻¹	58
Figura 3.10. Potencial zeta de la fracción arcilla en presencia de NaCl y CaCl ₂	59
Figura 4.1. (a) Potencial zeta del AH en NaCl y en CaCl ₂ ; (b) influencia de la concentración de iones calcio sobre el potencial zeta a pHs 5, 7 y 9; (c) efecto del	70

tiempo sobre el potencial zeta luego de variar la concentración de calcio desde 0 a 0,8 mM o a 2 mM.....	
Figura 4.2. (a) Espectros UV visible del sobrenadante de una solución de AH durante un experimento cinético a pH 5 y 1,6 mM de calcio. (b) Curvas cinéticas de agregación resultantes de los espectros mencionados arriba.....	72
Figura 4.3. Curvas cinéticas de agregación del AH a pH 5 y a diferentes concentraciones de calcio.....	74
Figura 4.4. Influencia de la concentración de calcio sobre la velocidad inicial de la reacción de agregación a pH 5, 7 y 9.....	76
Figura 4.5. Microfotografía óptica de agregados de AH formados luego de 60 min.....	77
Figura 4.6. Representación esquemática de los pasos involucrados en el proceso de agregación de AH en presencia de iones calcio.....	79
Figura 4.7. Relación E2/E3 vs. α para todas las condiciones experimentales estudiadas.....	80
Figura 5.1. Potencial zeta de la fracción arcilla, del AH, y de la fracción arcilla más AH, en presencia de NaCl y CaCl ₂	93
Figura 5.2. Influencia de la concentración de calcio sobre el potencial zeta de la fracción arcilla, del AH y de la fracción arcilla más AH.....	94
Figura 5.3. Isotermas de adsorción del AH sobre la fracción arcilla a diez concentraciones diferentes de calcio total.....	97
Figura 5.4. Adsorción de AH (Γ_{AH}) en función de la concentración de calcio (C_{Ca}) a cinco concentraciones diferentes de AH.....	99
Figura 5.5. Microfotografías ópticas de la fracción arcilla: (A) sin AH en el sistema, (B) con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 1 en la Figura 5.4, y (C) con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 2.....	100
Figura 5.6. Γ_{Ca} vs. C_{Ca} a diferentes concentraciones de AH total.....	102
Figura 5A.1. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos para una curva de calibración con AH a pH 7.....	108
Figura 5A.2. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos en un experimento donde el AH fue agregado parcialmente por la adición de calcio.....	109
Figura 5A.3. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos en un experimento donde el AH se adsorbió (agregó) sobre la superficie de la fracción arcilla del suelo.....	110

Figura 5A.4. Todos los espectros normalizados indicados en las Figuras 5A.1, 5A.2 y 5A.3.....	111
Figura 6.1. Curvas de calibración Absorbancia vs. concentración de fracción arcilla obtenidas con un espectrofotómetro Metrolab 1600 y Perkin Elmer Lambda35.....	121
Figura 6.2. a) Absorbancia vs. tiempo de una suspensión de fracción arcilla 400 mg L ⁻¹ en NaCl 0,4 M a pH 7, b) absorbancia normalizada de fracción arcilla (A/A ₀) vs. t para las condiciones experimentales indicadas en a).....	122
Figura 6.3. a) Influencia de la concentración de partículas e b) Influencia del pH, en las curvas de agregación/sedimentación de la fracción arcilla.....	124
Figura 6.4. Curvas de agregación/sedimentación de la fracción arcilla en diferentes electrolitos a pH 7: a) NaCl 0,1 a 1,0 M; b) CaCl ₂ 2 a 24 mM y c) CaCl ₂ 2,5 a 12 mM en presencia de AH 50 mg L ⁻¹	126
Figura 6.5. Curvas de estabilidad de partículas de fracción arcilla a pH 7, en NaCl y en CaCl ₂ en ausencia y en presencia de AH.....	129
Figura 6.6. Distribución de tamaño de las partículas de fracción arcilla en suspensión (25 mg L ⁻¹) en función del tiempo en un experimento cinético de agregación/sedimentación: a) en presencia de AH 10 mg L ⁻¹ , b) en presencia de AH 10 mg L ⁻¹ y NaCl 0,5 M y c) en presencia de AH 10 mg L ⁻¹ y CaCl ₂ 10 mM.....	131

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Propiedades físico químicas del suelo utilizado para la extracción del AH.	23
Tabla 2.2. Composición elemental de la muestra de AH determinada mediante el uso de dos autoanalizadores y valor promedio indicado en la literatura.....	24
Tabla 2.3. Relaciones atómicas derivadas para el AH y valores de referencia obtenidos de la literatura.....	24
Tabla 2.4. Parámetros espectroscópicos y relaciones calculadas para la muestra de AH.....	30
Tabla 3.1. Asignación de bandas IR de la fracción arcilla estudiada.....	54
Tabla 3.2. Composición elemental de la fracción arcilla determinada por fluorescencia de rayos X.....	55
Tabla 3.3. Comparación de la composición elemental de óxidos en la fracción arcilla y en los minerales de arcilla predominantes.....	56
Tabla 3.4. Composición elemental de la fracción arcilla determinada por fluorescencia y EDAX.....	57
Tabla 4.1. Parámetros cinéticos.....	75
Tabla 6.1. Parámetros cinéticos de agregación de la fracción arcilla en NaCl.....	127
Tabla 6.2. Parámetros cinéticos de agregación de la fracción arcilla en CaCl ₂ con y sin agregado de AH (50 mg L ⁻¹).....	128

Capítulo 1. Introducción General

1.1. Antecedentes

Según un informe de la ONU (1), en el año 2030 1.400 millones de personas se sumarán a la población actual, y el 60% del total residirá en zonas urbanas, donde la mayor demanda de alimentos y fibras no sólo se deberá al aumento del número de habitantes, sino también a las pautas de consumo urbanas. A ello se suma la producción destinada a la obtención de biocombustibles y la presión originada por la desregulación de los mercados por especulación financiera (2)

Hasta el momento, los modelos productivistas, que direccionaron los avances en ciencia y tecnología, permitieron cubrir la creciente demanda de productos agropecuarios, pero estos han sido poco efectivos para atender los impactos ambientales y sociales no deseados. En nuestro país, la aplicación de este tipo de modelos en las últimas décadas tuvo como consecuencia que la superficie dedicada a agricultura se expandiera en alrededor del 30%, llegando prácticamente al límite de las tierras aptas disponibles, mientras que la superficie dedicada a monocultivo, en igual período, se triplicó, cubriendo en la actualidad cerca del 75% de la superficie cultivada. Así, muchas producciones regionales, al igual que la producción ganadera, fueron reemplazadas por monocultivos o desplazadas a regiones marginales con las consecuencias lógicas de desplazamiento de la población rural, degradación de ecosistemas frágiles (montes naturales degradados, desaparición de humedales, etc.) e incremento del riesgo de la producción (3)

Para aprovechar la creciente demanda de alimentos y fibras, bajo un modelo de producción sustentable que garantice mayores saldos exportables y la seguridad alimentaria interna, pero con fuertes limitaciones en la disponibilidad de tierra y agua y con problemas ambientales no resueltos, es necesario fijar una adecuada estrategia de producción agropecuaria (4). En este contexto, el modelo agroecológico se presenta como una interesante alternativa de gestión de la producción. Éste modelo permite que la actividad agrícola sea más sostenible al trabajar con los ecosistemas de forma integrada, utilizando recursos renovables y locales, conservando la fertilidad del suelo, manteniendo una mayor biodiversidad, disminuyendo la aplicación de agroquímicos y haciendo un mejor uso del agua. (5)

Aún existen muchas vacancias en el desarrollo de conocimientos sobre el manejo del suelo y el agua, si se pretende resolver los problemas productivos y ambientales, especialmente dentro del modelo agroecológico, en los procesos de reciclado de residuos agropecuarios, urbanos e industriales, degradación de pesticidas y otros servicios ecosistémicos del suelo. El manejo de esos procesos requiere de un conocimiento profundo de los mecanismos que los gobiernan, a fin de detectar a tiempo variaciones en su evolución y poder predecir potenciales deterioros de los recursos naturales involucrados.

1.2. El suelo

El suelo es considerado la lámina más activa de la superficie de la tierra. Para el año 2050, los suelos de todo el mundo deberán proveer servicios de variado tipo a una población estimada de 9600 millones de habitantes (6). Entre ellos se destacan:

1. Servicios de soporte para el ciclado de nutrientes, retención y liberación de agua, formación de suelo, intercambio de gases con la atmósfera, entre otros.
2. Servicios de a) regulador de clima, a través del secuestro de carbono desde la atmósfera y control de emisiones de gases con efecto invernadero, b) regulador de flujos de agua, incluyendo filtración y purificación, c) regulador de calidad de aire, por atenuación de contaminantes de erosión eólica, entre otros.
3. Servicios de provisión de alimentos, combustibles, fibras, agua, fuentes minerales, entre otros.
4. Servicios culturales, como preservación de la arqueología, recreación, intereses religiosos.

Por lo tanto asegurar una buena calidad de suelo se considera de vital importancia para el sostenimiento global de la biosfera.

La estructura del suelo es un factor clave de calidad, y le permite llevar a cabo sus funciones ecosistémicas de regulación de agua y flujo de gases, reserva de agua y nutrientes, penetración y crecimiento de raíces entre otras. La estructura del suelo puede definirse como el arreglo de minerales primarios y partículas orgánicas del suelo en unidades secundarias llamadas agregados.

En el espacio interagregado se generan poros que almacenan agua y aire. La proporción aproximada de poros ocupados por agua y aire respecto de las partículas minerales y orgánicas puede observarse en la Figura 1.1.

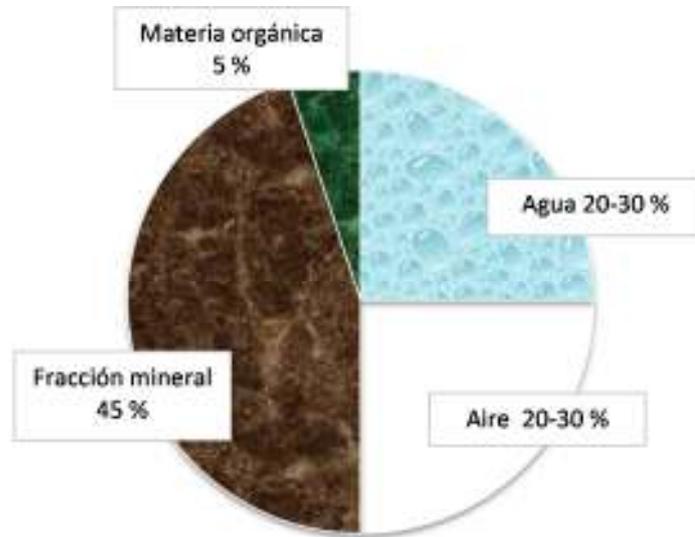


Figura 1.1. Fases del sistema suelo.

Por lo tanto, el suelo puede verse como una mezcla heterogénea de partículas primarias (arena, limo, arcilla y materia orgánica) las cuales se organizan en niveles jerárquicos de diferente complejidad por medio de procesos interfaciales que unen estas partículas, tales como la agregación o floculación (7) (8) (9). La importancia fundamental de la materia orgánica en la formación de la estructura y fertilidad del suelo es bien reconocida (10).

La agregación de las partículas del suelo depende fundamentalmente de su composición. Las partículas primarias del suelo difieren no solo en su tamaño, sino también en su composición. Los minerales menos estables, como carbonatos y feldespatos tienden a acumularse en las fracciones de tamaño arena y limo (2 – 2000 μm). Estas son relativamente inactivas desde el punto de vista fisicoquímico, debido a su baja carga eléctrica y área superficial. En contraste, la fracción arcilla (< 2 μm) concentra los materiales de suelo más activos, tales como filosilicatos y oxo-hidróxidos metálicos. Debido al pequeño tamaño de sus partículas y su gran área superficial, la fracción arcilla se considera la fracción coloidal del suelo (11) (12) (9). Esta última es una fracción crítica en el desarrollo de estructura del suelo, dado que favorece la formación de complejos órgano-minerales y de poros de menor tamaño.

Uno de los principales procesos de degradación de la calidad del suelo es la pérdida de estructura que ocurre en los suelos agrícolas (11) (13). En muchos casos, esta pérdida de estructura se atribuye a la ruptura de los agregados y a la dispersión coloidal de las partículas. La ruptura de los agregados produce una exposición del carbono orgánico protegido a los procesos de mineralización microbiana lo cual puede incrementar la mineralización y emisión de dióxido de carbono (14). Además, la dispersión de partículas coloidales de tamaño $< 2 \mu\text{m}$ modifica la estructura y contribuye a la erosión hídrica del suelo. Un transporte rápido de coloides dispersos en agua a través de vías preferenciales en la estructura porosa del suelo ha sido considerado como un mecanismo potencial para la contaminación con sustancias químicas unidas a la materia orgánica asociada a coloides (15).

La liberación y el transporte de coloides en los suelos agrícolas están condicionados por el flujo hidrodinámico del agua y por las condiciones químicas de la solución del suelo. La presencia de materia orgánica, el pH, la concentración y tipo de electrolitos son factores cruciales que determinan la concentración de coloides dispersos en agua (7) (16).

1.3. La materia orgánica

La materia orgánica del suelo se define como la fracción orgánica del suelo, excluidos los residuos animales y vegetales aun no descompuestos. Representa un sistema complejo de sustancias cuya dinámica es gobernada por el aporte de residuos orgánicos de diversa naturaleza y por la transformación continua a través de factores biológicos, químicos y físicos. Es por eso que incluye una variedad importante de compuestos de complejidad variable (10).

El principal constituyente de la materia orgánica es el carbono, que llega a representar entre el 40 y el 60 % de su masa dependiendo del grado de transformación. Un esquema simplificado del ciclo del carbono se muestra en la Figura 1.2. Las plantas en presencia de agua, nutrientes y energía toman el dióxido de carbono del aire para transformarlo en compuestos orgánicos. Una vez concluido el ciclo de la planta o alguna de sus partes, ingresa al suelo donde es activamente transformado por los microorganismos. En este proceso

los microorganismos obtienen nutrientes y energía, una gran parte del carbono vuelve a la atmósfera como dióxido de carbono, y otra sufre transformaciones de resíntesis y polimerización dando lugar a las sustancias húmicas (SH).

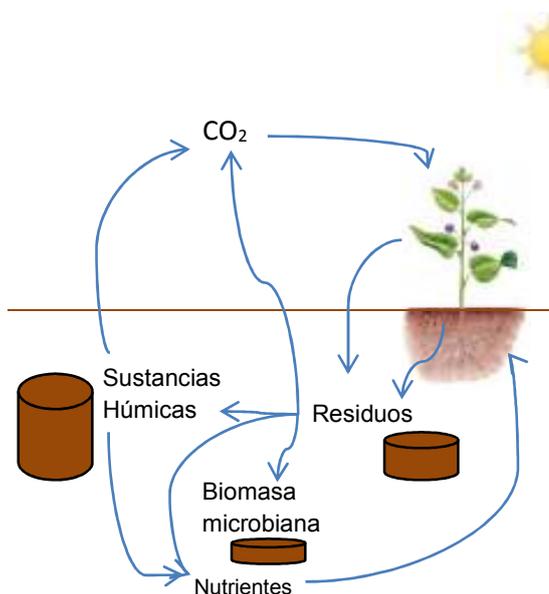


Figura 1.2. Principales flujos de carbono en el sistema suelo-planta-atmósfera.

El proceso de transformación biológica de los residuos orgánicos es característico de cada sistema y es un factor determinante en la liberación de nutrientes. Es decir, la materia orgánica es un elemento clave en relación con la fertilidad de los suelos y la productividad de los cultivos. Esto es particularmente importante en ambientes semiáridos y subhúmedos, donde influye favorablemente sobre la dinámica del agua y de los nutrientes (17).

La materia orgánica de suelo, agua y sedimentos incluye sustancias no húmicas y SH. Las primeras comprenden al material orgánico menos transformado, responsable de la disminución de materia orgánica al cultivar suelos vírgenes y es fácilmente alterable por las prácticas de manejo agronómico. Las segundas corresponden al material más estable, más resistente a la degradación, encontrándose en mayor proporción en los suelos comparado con las fracciones más lábiles (18) (9).

Para la fertilidad del suelo son tan importantes las SH como los residuos menos transformados o la biomasa microbiana. Un enfoque integral de la materia orgánica del suelo debería considerar la calidad y las transformaciones

de las fracciones orgánicas, así como el ambiente donde interaccionan el sustrato y los microorganismos. En este sentido, los diferentes mecanismos de protección de la materia orgánica en el suelo tienen un importante rol en la velocidad de las transformaciones.

Se conoce que la materia orgánica del suelo puede alojarse en diferentes sitios: adsorbida a partículas minerales, dentro de microagregados, dentro de macroagregados pero por fuera de los microagregados y puede encontrarse como materia orgánica libre. Estas diferentes localizaciones implican diferente estabilidad, propiedades e interacciones en el suelo (9).

Se han realizado estudios a nivel local respecto de los contenidos de carbono y velocidad de respiración en fracciones de agregados para evaluar el efecto de diferentes sistemas de labranza (14). Sin embargo hay poca información respecto de los mecanismos involucrados en el almacenamiento y conservación de carbono en fracciones más estables, tal como las SH (19).

1.4. Estudios de adsorción / agregación de SH en suelos

Las SH pueden unirse a la fracción mineral del suelo a través de una variedad de mecanismos que dependen de las propiedades del material orgánico, de la superficie mineral y de las condiciones químicas de la solución del suelo, tales como pH, fuerza iónica y presencia de cationes (20) (21).

Las isotermas de adsorción son utilizadas para describir la adsorción en la interface sólido/líquido cuantitativamente. Estas representan la distribución de los solutos entre el solvente líquido y el adsorbente sólido a temperatura constante bajo condiciones de equilibrio. La cantidad de soluto adsorbida en función de la concentración de equilibrio cuantifica el proceso de adsorción, mientras que la forma de las isotermas puede proveer información cualitativa de la naturaleza de las interacciones del soluto con la superficie (8) (9).

La adsorción de SH por minerales ha sido investigada en numerosas publicaciones empleando isotermas de adsorción, donde los aspectos cualitativos de pares de compuestos mineral – SH han sido el punto de estudio (22) (23) (24) (25) (26). Se han observado isotermas de diferente forma en función de los pares de compuestos estudiados. La afinidad de las SH por las superficies minerales varía con la composición química de la superficie del

mineral debido a los diferentes mecanismos de interacción involucrados. Por ejemplo los óxidos de hierro y aluminio adsorben SH principalmente a través del intercambio de ligando al igual que la kaolinita. Mientras que la montmorrillonita adsorbe SH principalmente por puentes catiónicos y efectos hidrofóbicos (8).

En los estudios de adsorción se ha observado numerosas veces el fraccionamiento de las SH luego de la adsorción (22) (23) (27) (28), siendo en general los compuestos orgánicos hidrofóbicos con alto peso molecular los que se adsorben preferentemente a las superficies minerales. Por otra parte, los componentes orgánicos que permanecen en solución son menos aromáticos, lo cual sugiere una adsorción selectiva que podría influir en la distribución de componentes orgánicos en suelos y aguas. Otros estudios han demostrado que diferentes arcillas u óxidos exhiben una adsorción selectiva hacia diferentes componentes orgánicos de las SH (28) (29).

Además del fraccionamiento de SH mencionado, la conformación del material orgánico adsorbido a la superficie mineral es un detalle importante a tener en cuenta cuando se analiza la estructura de los complejos órgano-minerales formados. Varios autores han reportado la existencia de una cobertura orgánica como bilámina sobre la superficie mineral. Ghabbour et al. (30) sugirieron que la adsorción de AH sobre minerales ocurre en dos pasos consecutivos, el primer paso es la formación de una monolámina y el segundo paso es la asociación de moléculas de AH "libres" con el AH adsorbido. Vermeer et al. (31) midieron el espesor de la lámina de AH adsorbido sobre partículas minerales y concluyeron que el húmico adsorbido puede describirse como una lámina dinámica que se extiende hacia la solución. Usando microscopía de fuerza atómica, Namjesnik-Dejanovic y Maurice (32) observaron esferas de materia orgánica y biláminas sobre las partículas minerales y concluyeron que la conformación de los húmicos sorbidos representa agregados y estructuras complejas.

Es importante considerar que la adsorción, el fraccionamiento y la conformación (u arreglo estérico) de las SH en la superficie de los minerales ocurre de manera diferente dependiendo de las propiedades de la solución. Factores tales como la concentración de mineral, el pH, la fuerza iónica, la concentración relativa de cationes mono y polivalentes, y la temperatura tienen

un impacto sobre la adsorción de SH (22) (33) (25). La saturación de arcillas con cationes polivalentes puede mejorar la adsorción de SH sobre las superficies minerales. Majzik y Tombácz (25) concluyeron que los cationes multivalentes como el calcio tienen una influencia importante en el proceso de adsorción de AH sobre la superficie de arcillas, particularmente bajo condiciones medioambientales.

1.5. Estudios cinéticos de agregación / sedimentación de SH y minerales

La movilidad de las partículas en la solución del suelo y en aguas depende de su tendencia a permanecer en suspensión, por lo que una evaluación de su tendencia a la agregación permite predecir cuál será su velocidad de sedimentación y por lo tanto su remoción desde la fase acuosa (34). Buena información acerca de los mecanismos de interacción entre partículas coloidales puede obtenerse a partir de estudios cinéticos. Se conoce que las SH influyen la velocidad de agregación de coloides por adsorberse a la superficie de las partículas, inducir fuerzas electrostáticas repulsivas y generar impedimentos estéricos que alteran la cinética de agregación (35) (36) (37).

Es importante considerar los factores que influyen la cinética del proceso de agregación de SH. Se ha observado que la disminución del pH promueve la formación de agregados debido a la protonación de grupos funcionales de las SH (carboxilatos y fenolatos), lo cual disminuye la repulsión electrostática entre las moléculas y favorece la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares. La agregación también ocurre por la presencia de cationes, vía neutralización de cargas y formación de puentes catiónicos (38) (39). Sin embargo no existen datos concretos acerca de la cinética de estos procesos ni del mecanismo por el cual la agregación o precipitación de AH y minerales tienen lugar en medios acuosos.

1.6. Objetivo y Diagramación de la tesis

El objetivo general de esta tesis es estudiar la interacción de las SH, particularmente la fracción de ácidos húmicos (AH), con la solución del suelo y con la fracción arcilla del suelo. Para esto se realizaron tres tipos de estudios.

En primer lugar se evaluó el comportamiento de agregación de las moléculas de AH en solución en presencia de iones calcio y pH variables, que representan las condiciones de la solución del suelo. Luego se estudió la adsorción/agregación de AH a la fracción arcilla extraída del suelo, analizando el efecto de concentraciones variables de iones calcio. Finalmente se estudió el comportamiento de sedimentación de la fracción arcilla, analizando el efecto de iones sodio y calcio y la presencia de AH. Se hace énfasis en la cinética de los procesos de adsorción y agregación y en el efecto del calcio en estos procesos.

La tesis se ha estructurado en capítulos de la siguiente manera:

Capítulo 2. Extracción y caracterización del AH del suelo. Se describe el método de extracción del AH y los resultados obtenidos de caracterización físico-química que ayudan a dilucidar su reactividad en presencia de cationes metálicos y minerales del suelo.

Capítulo 3. Extracción y caracterización de la fracción arcilla del suelo. Se describe el método de separación de la fracción arcilla y los resultados obtenidos de caracterización físico-química que ayudan a dilucidar su reactividad en presencia de AH y cationes metálicos.

Capítulo 4. Cinética de agregación del AH: efecto del pH y de iones calcio. Los efectos del pH y la concentración de calcio son investigados a fin de desarrollar un mecanismo de agregación simple y obtener información respecto de la dinámica de los AH en el medioambiente. Este capítulo dio lugar a un artículo publicado en *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 427:76-82, 2013.

Capítulo 5. Interacción del AH y la fracción arcilla: adsorción y agregación superficial. Los efectos del calcio sobre el comportamiento de adsorción/agregación del AH son evaluados a partir de medidas de potencial zeta, microscopía e isothermas de adsorción de AH y de calcio. La posibilidad de agregación superficial es especialmente abordada e investigada. Este capítulo dio lugar a un artículo publicado en *Environmental Chemistry*, <http://www.publish.csiro.au/paper/EN14157.htm>, 2015.

Capítulo 6. Estudio de Agregación / Sedimentación de la fracción arcilla del suelo. Se presenta una evaluación de la cinética del proceso en presencia de AH y cationes sodio y calcio.

Capítulo 7. Conclusiones finales.

1.7. Bibliografía

1. Department of Economic and Social Affairs. 2012. Population Division: World Urbanization Prospects. United Nations. New York. pp 2.
2. Chandrasekhar CP & Ghosh J. 2012. "Addressing the Global Food Crisis: Causes, Implications, and Policy Options". Review of Agrarian Studies. 1:44-70.
3. Solbrig O. 2008. Foro de la Cadena Agroindustrial Argentina. [En línea]. Último acceso: 09 de 06 de 2015. <http://www.foroagroindustrial.org.ar/home.php>.
4. MAGyP. 2010. Programa Nacional Agroalimentario participativo y federal 2010-2016.
5. Altieri M & Toledo VM. 2011. The agroecological revolution of Latin America: rescuing nature, securing food sovereignty and empowering peasants. The Journal of Peasant Studies. 38:587-612.
6. Milne E & otros. 2015. Soil Carbon, multiple benefits. Environmental Development. 13:33-38.
7. Conklin AR. 2005. Introduction to soil chemistry, analysis and instrumentation. Chapter 8, Spectroscopy. John Wiley & Sons. New Jersey. pp 147-173.
8. Chilom G & Rice JA. 2009. Organo-clay complexes in soils and sediments. En: Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Ed. Senesi N, Xing B, Min Huang P. John Wiley. New Jersey. pp 111-145.
9. Molina FV. 2014. Soil Colloids properties and ion binding. CRC Press. pp 545.
10. Hayes MHB. 2009. Evolution of concepts environmental natural nonliving organic matter. En: Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Ed. Senesi N, Xing B, Min Huang P. John Wiley. New Jersey. pp 2-40.
11. Hillel D. 2004. Introduction to environmental soil physics. Elsevier Academic press. Massachusetts USA. pp 485.
12. Jiang C, Sequaris JM, Vereecken H, Klumpp E. 2012. Effects of inorganic and organic anions on the stability of illite and quartz soil colloids in Na-, Ca- and mixed Na-Ca systems. Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects. 415:134-141.
13. Bronick CJ & Lal R. 2005. Soil structure and management: a review. Geoderma. 124:3-22.
14. Fernandez R, Quiroga A, Zorati C, Noellemeyer E. 2010. Carbon contents and respiration rates of aggregate size fractions under no-till and conventional tillage. Soil & Tillage Research, 109:103-109.
15. Frimmel FH & Abbt-Braun G. 2009. Dissolved organic matter in natural environments. En: Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Ed. Senesi N, Xing B, Min Huang P. John Wiley. New Jersey. pp 367-406.

16. Kanti Sen T & Khilar KC. 2006. Review on subsurface colloids and colloid-associated contaminant transport in saturated porous media. *Advances in Colloid and Interface Science*. 119:71-96.
17. Quiroga A, Fernandez R, Funaro D, Peinemann N. 2008. Materia orgánica en Molisoles de la Región Semiárida Pampeana. Influencia sobre propiedades físicas y productividad. En: Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina. Ed. Galantini JA. EdiUNS. Bahía Blanca. pp 97-130.
18. Galantini J, Iglesias J, Landriscini M, Suñer L, Minoldo G. 2008. Calidad y dinámica de las fracciones orgánicas en sistemas naturales y cultivados. En: Estudio de las fracciones orgánicas en suelos de la Argentina. Ed. Galantini JA. EdiUNS. Bahía Blanca. pp 71-95.
19. Hevia GG, Buschiazzi DE, Hepper EN, Urioste AM, Anton AL. 2003. Organic matter in size fractions of soils of the semiarid Argentina. Effects of climate, soil texture and management. *Geoderma*. 116:265-277.
20. Six J, Conant RT, Paul EA, Paustian K. 2002. Stabilization mechanisms of soil organic matter: Implications for C-saturation of soils. *Plant and Soil*. 241:155-176.
21. Tombacz E, Filipcsei G, Szekeres M, Gingl Z. 1999. Particle aggregation in complex aquatic systems. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 151:233-244.
22. Hur J & Schlautman MA. 2004. Effects of pH and phosphate on the adsorptive fractionation of purified Aldrich humic acid on kaolinite and hematite. *Journal of Colloid and Interface Science*. 277:264-270.
23. Ghosh S, Wang Z, Kang S, Bhowmik PC, Xing BS. 2009. Sorption and Fractionation of a Peat Derived Humic Acid by Kaolinite, Montmorillonite, and Goethite. *Pedosphere*. 19:21-30.
24. Illes E & Tombacz E. 2004. The role of variable surface charge and surface complexation in the adsorption of humic acid on magnetite. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 230:99-109.
25. Majzik A & Tombacz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions I. Interfacial and aqueous phase equilibria: Adsorption and complexation. *Organic Geochemistry*. 38:1319-1329.
26. Wershaw RL, Leenheer JA, Sperline RP, Song Y, Noll LA, Melvin RL, Rigatti GP. 1995. Mechanism of formation of humus coatings on mineral surfaces 1. Evidence for multidentate binding of organic acids from compost leachate on alumina. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspect*. 96:93-104.
27. Chilom G, Bruns AS, Rice JA. 2009. Aggregation of humic acid in solution: Contributions of different fractions. *Organic Geochemistry*. 40:455-460.

28. Janot L, Benedetti MF, Reiller PE. 2011. Colloidal γ -Al₂O₃, Europium(III) and Humic Substances Interactions: A Macroscopic and Spectroscopic Study. *Environ. Sci. Technol.* 45: 3224–3230.
29. Kang S & Xing B. 2008. Humic acid fractionation upon sequential adsorption onto goethite. *Langmuir.* 24:2525–2531.
30. Ghabbour EA, Davies G, Goodwillie ME, O'Donaught K, Smith T. 2004. Thermodynamics of Peat-, Plant-, and Soil-Derived Humic Acid Sorption on Kaolinite. *Environ. Sci. Technol.* 38:3338–3342.
31. Vermeer AWP, van Riemsdijk WH, Koopal LK. 1998. Adsorption of Humic Acid to Mineral Particles. 1. Specific and Electrostatic Interactions. *Langmuir.* 14:2810–2819.
32. Namjesnik-Dejanovic K & Maurice PA. 2000. Conformations and aggregate structures of sorbed natural organic matter on muscovite and hematite. *Geochimica et Cosmochimica Acta.* 65:1047–1057.
33. Komy ZR, Shaker AM, Heggy SEM, El-Sayed MEA. 2014. Kinetic study for copper adsorption onto soil minerals in the absence and presence of humic acid. *Chemosphere.* 99:117-124.
34. Tipping E. 2002. Cation Binding by Humic Substances. Cambridge University. New York.
35. Chen KL & Elimelech M. 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 309:126-134.
36. Séquaris JM. 2010. Modeling the effects of Ca²⁺ and clay-associated organic carbon on the stability of colloids from topsoils. *Journal of Colloid and Interface Science.* 343:408-414.
37. Deonarine A, Lau BLT, Aiken GR, Ryan JN, Hsu-Kim H. 2011. Effects of humic substances on precipitation and aggregation of zinc sulfide nanoparticles. *Environ Sci. Technol.* 45:3217-3223.
38. Baalousha M, Motelica-Heino M, Le Coustumer P. 2006. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 272:48-55.
39. Brigante M, Zanini G, Avena M. 2009. Effects of pH, anions and cations on the dissolution kinetic of the humic acid particles. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 347:180-186.

Capítulo 2. Extracción y Caracterización del Ácido Húmico del Suelo

2.1 Introducción

Como se menciona en el Capítulo 1, la materia orgánica o componentes orgánicos de suelos, aguas y sedimentos incluyen sustancias no húmicas y SH. Las sustancias no húmicas corresponden a materiales orgánicos cuyas características químicas son identificables, tales como glúcidos, proteínas, ácidos orgánicos, etc., la mayoría de ellos son biodegradables y tienen una corta vida en los suelos. Las SH, por el contrario, son moléculas orgánicas complejas, formadas a partir de la descomposición de residuos vegetales, animales y microbianos, que se caracterizan por no presentar características físicas y químicas específicas, tales como composición elemental definida y punto de fusión concreto, entre otros aspectos (1).

Las SH son abundantes y persistentes en la biosfera y se presentan tanto en forma particulada como disuelta en suelos, agua y sedimentos (2). Participan en la estabilización de agregados de suelos, en la movilización de sustancias químicas orgánicas e inorgánicas y en el secuestro de carbono desde el dióxido de carbono atmosférico (3), por lo que cumplen un rol fundamental en el área agronómica y medioambiental. Sin embargo, a pesar de las numerosas investigaciones que se han llevado a cabo con SH, no se sabe todavía con certeza cómo las SH cumplen estos roles, y se requiere más información sobre su interacción con otras moléculas orgánicas, con iones metálicos y con los coloides inorgánicos del suelo.

Hay dos opiniones diferentes respecto de la estructura molecular de las SH (4). Desde el punto de vista tradicional, se propone que las SH son una mezcla de moléculas poliméricas relativamente grandes que varían en tamaño desde 2000 Da para las fracciones más pequeñas a 1.300.000 Da para las moléculas más grandes (5). En cambio, de acuerdo a conceptos modernos, las SH son consideradas como ensamblados supramoleculares de moléculas más pequeñas, de tamaño aún no definido, las cuales forman asociaciones dinámicas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (6) (7). Este último concepto ha ganado muchos adeptos en las últimas décadas (8) (9).

La persistencia de las SH en suelos y otros medios naturales se atribuye a las asociaciones que estas experimentan en el ambiente. Entre las interacciones más importantes deben destacarse las que involucran cationes,

tales como iones metálicos del tipo calcio, cobre, plomo, aluminio, hierro, entre otros. La interacción de las SH con cationes ocurre tanto en su forma inmóvil, en la fase sólida de suelos y sedimentos, como en su forma disuelta, la cual puede ser móvil y transportar estos iones. La unión de cationes a las SH ejerce un control sobre la reactividad del catión, incluyendo su biodisponibilidad, e influye sobre el estado fisicoquímico del humus, modificando por ejemplo su estado de adsorción o agregación (2). De particular importancia son las asociaciones con coloides inorgánicos del suelo. La afinidad de las SH por las superficies de minerales varía con la composición química del mineral, debido a que están involucrados diferentes mecanismos de interacción. El intercambio de ligando se propone como mecanismo a la adsorción de SH sobre óxidos de hierro y aluminio, mientras que puentes catiónicos e interacciones hidrofóbicas son utilizados para explicar la adsorción de SH sobre minerales de arcilla que poseen cargas estructurales negativas, como la montmorillonita (10).

Las SH son definidas operacionalmente en términos del método usado para extraerlas del suelo, sedimentos o agua. El procedimiento de extracción clásico aísla tres fracciones principales: ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y huminas. Estas fracciones son definidas en términos de su solubilidad en medio acuoso como función del pH. El AH es la fracción de sustancia húmica que no es soluble en agua bajo condiciones de pH menor a 2. El AF es la fracción soluble en medio acuoso a todos los valores de pH. Mientras que la humina es la fracción insoluble en medio acuoso en todo el rango de pH (11). Dentro de la comunidad científica hay una discusión respecto de cuan representativas son las fracciones de SH aisladas del material orgánico en su estado natural (2). Sin embargo, es inevitable aislar las fracciones para poder caracterizarlas, y el aislamiento de SH es hoy la aproximación más empleada para el estudio de sus interacciones y funciones en el ambiente (3).

Se han publicado en la literatura varios métodos para aislar SH de suelos, sedimentos y aguas. En gran medida estos dependen del control de la carga eléctrica de las diferentes moléculas: si éstas están altamente cargadas (a pH elevado) son más solubles, cuando la carga disminuye (pH bajo), ocurre la precipitación de las moléculas (2). La Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas ha propuesto un método de aislamiento y fraccionamiento de SH (12),

que recomienda aplicar a diferentes estudios para lograr resultados comparables.

Hay mucha información disponible en la literatura sobre las SH, considerando su rol en el medioambiente, pero dicha información no es bien comprendida. A pesar de las diferencias existentes entre las SH de distinto origen, la uniformidad en muchas de sus propiedades es evidente, independientemente de la diversidad en la localización geográfica, origen y condiciones climáticas en las que se han generado (9). A nivel químico se conoce el contenido elemental promedio y en cierto grado el contenido de grupos funcionales que puede tener una muestra de húmico, pero la información sobre la estructura de las SH es mucho más incierta (13). Se sabe que son mezclas de muchos componentes, por lo que más que esperar obtener una fórmula molecular definida, las técnicas de caracterización constituyen la base para la justificación de su reactividad química.

El objetivo de este capítulo es aislar y fraccionar un AH proveniente de un suelo de la Región Semiárida Pampeana Argentina, y realizar una caracterización físico-química del mismo que ayude a dilucidar su reactividad en presencia de cationes metálicos y minerales del suelo.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Muestreo y análisis de suelo

Una muestra compuesta de tres sub-muestras de suelo se extrajo a 20 cm de profundidad desde un suelo agrícola (labranza convencional) de la Región Semiárida Pampeana Argentina clasificado como Haplustol Entico (14) (36°10'S- 64°19'O). En la Figura 2.1 se indica la ubicación del punto de muestreo. La muestra de suelo se secó al aire y se tamizó con un tamiz de 2 mm de malla. Se analizaron los siguientes parámetros físicos y químicos sobre la muestra de suelo: la composición granulométrica empleando el método del hidrómetro de Bouyoucos (15), el pH en pasta, el contenido de carbono y nitrógeno total por combustión seca (16) y la capacidad de intercambio catiónico con acetato de amonio a pH 7 (17).

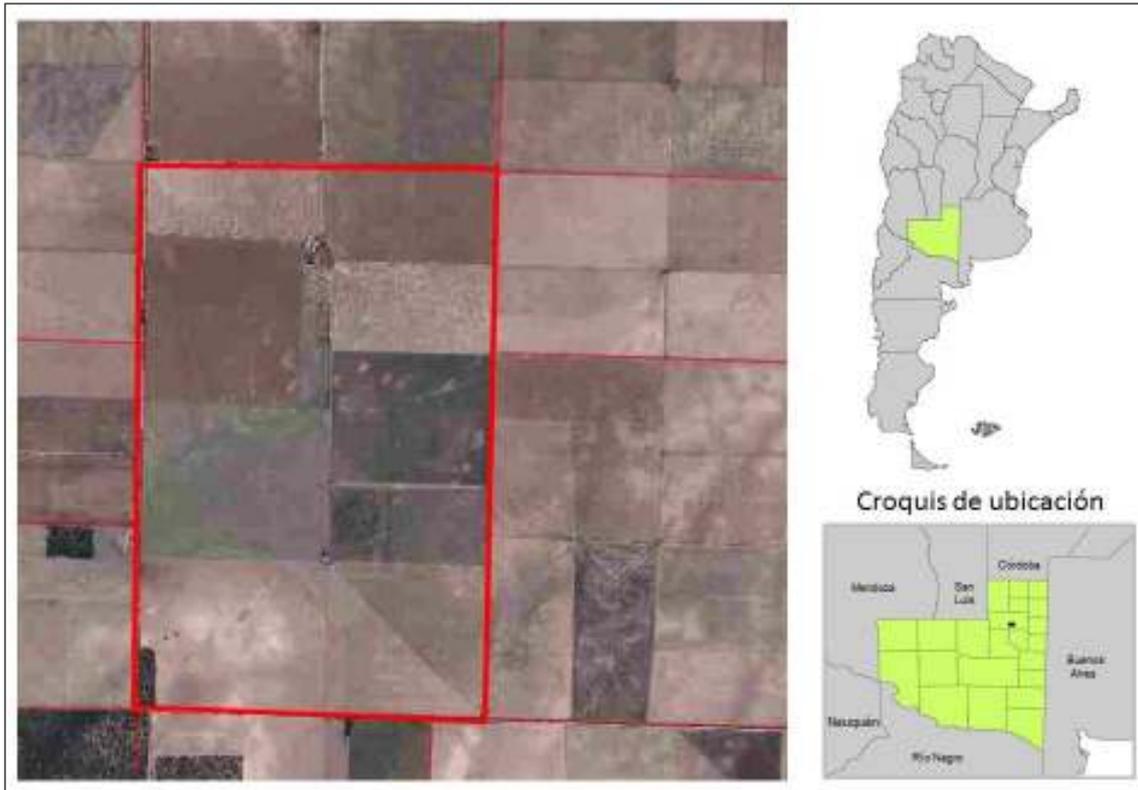


Figura 2.1. Croquis de ubicación del sitio de muestreo de suelo. Se muestra una imagen satelital (izq.), un mapa de la provincia de La Pampa con el punto que indica el sitio de muestreo (der. inf.) y un mapa de la República Argentina donde se ubica la provincia (der. sup.).

A continuación se describe el método utilizado en este trabajo para la extracción del AH del suelo, y posteriormente las técnicas de caracterización aplicadas al AH en estudio.

2.2.2. Extracción de AH

El AH se extrajo, purificó y liofilizó a partir de la muestra de suelo de acuerdo al procedimiento recomendado por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (12). El mismo consta de varias etapas, que se culminan en un mínimo de 6-7 días de trabajo de laboratorio. A continuación se describen las etapas del procedimiento, separadas de acuerdo a sucesivos días de trabajo:

Día 1. La muestra de suelo se secó al aire, se removieron las raíces y se tamizó empleando un tamiz de 2 mm.

Día 2. Se adicionó a la muestra un volumen de HCl 0,1 M a fin de tener una relación ácido a muestra de 10:1, ajustando el pH de la suspensión a un valor

entre 1 y 2. Se agitó la suspensión durante 1 h, se dejó la suspensión en reposo y luego se separó el sobrenadante (con AF fracción 1) del residuo (con AH) por decantación. El residuo de suelo se llevó a pH 11 con NaOH 1 M, luego se adicionó NaOH 0,1 M bajo atmósfera de nitrógeno hasta obtener una relación solución a suelo de 10:1. Se agitó la suspensión durante 4 h bajo atmósfera de nitrógeno. Se dejó la suspensión en reposo toda la noche.

Día 3. Se recolectó el sobrenadante (con AH) por decantación, separándolo de la fase precipitada (con huminas). El sobrenadante se acidificó con HCl 6 M bajo agitación constante hasta pH 1, y luego se dejó la suspensión en reposo por 12 h.

Día 4. Se centrifugó para separar el residuo de AH del sobrenadante (con AF fracción 2). Se redisolvió la fracción de AH adicionando, bajo atmósfera de nitrógeno, un volumen de KOH 0,1 M hasta lograr pH 11. Se adicionó KCl hasta obtener una concentración 0,3 M y luego se centrifugó a alta velocidad para remover los sólidos suspendidos. Se reprecipitó el AH por adición de HCl 6 M hasta pH 1 bajo agitación continua y se dejó la suspensión en reposo nuevamente durante 12 h.

Día 5. Se centrifugó y se descartó el sobrenadante. Se suspendió el AH precipitado con solución de HF 0,3 M / HCl 0,1 M, para reducir la presencia de sólidos inorgánicos, y se agitó toda la noche a temperatura ambiente.

Día 6. Se transfirió el precipitado a una bolsa de diálisis, y se dializó contra agua destilada hasta que el agua de diálisis dio valores negativos al test de cloruros con AgNO_3 .

Día 7. Se liofilizó la muestra y se guardó en un tubo plástico con tapa.

En la Figura 2.2 se observa un esquema que resume las etapas de extracción y purificación mencionadas previamente.

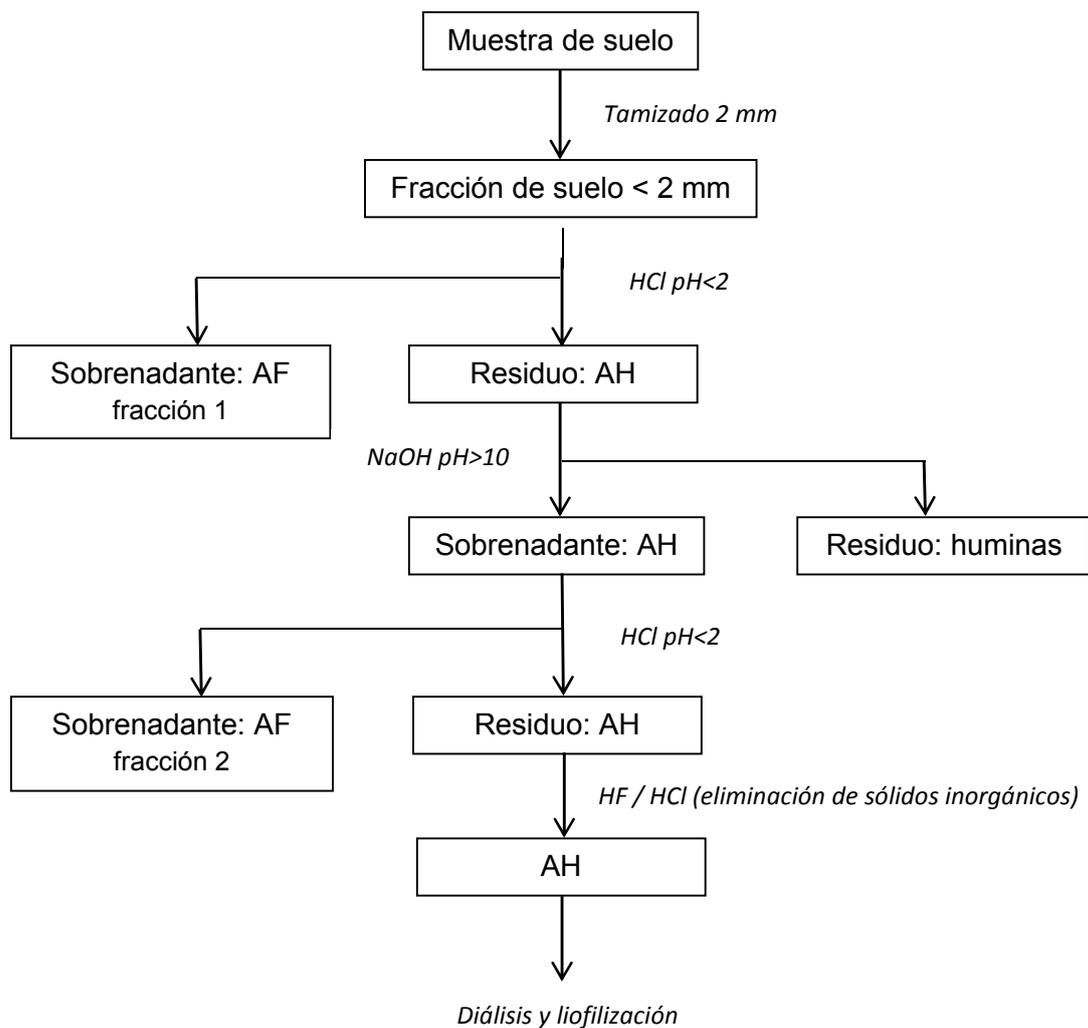


Figura 2.2. Esquema general de las etapas del procedimiento de extracción y purificación del AH.

2.2.3. Análisis elemental

La composición elemental del AH obtenido a partir de la muestra de suelo fue determinada por combustión seca (16) empleando un autoanalizador EXETER CE 440. El contenido de carbono y nitrógeno fue paralelamente determinado en el laboratorio de suelos de INTA Anguil empleando un autoanalizador LECO Truspec CN. En el autoanalizador la muestra es oxidada de forma rápida (950-1000 °C) de modo tal que todo el material orgánico e inorgánico es transformado en productos de combustión. Estos últimos son cuantificados según su contenido de carbono empleando un detector IR, y según su contenido de nitrógeno y oxígeno empleando una celda de

conductividad térmica. El contenido de hidrógeno se determina comúnmente por diferencia con los demás elementos. Además se cuantificó el contenido de cenizas calcinando la muestra a 750 °C durante 4 h.

2.2.4. Microscopía Electrónica de Barrido

La microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) fue utilizada para investigar el tamaño y forma de las partículas sólidas de AH. Se utilizó un microscopio JEOL 35 CF equipado con un detector de electrones secundarios. La muestra se preparó en una matriz de grafito recubierta con una lámina de oro de aproximadamente 300 Å. Debido a que el equipo utilizado tiene acoplado también un analizador de rayos X dispersivo en energía (Energy Dispersive X-Ray, EDAX), el mismo fue utilizado para un análisis semicuantitativo de la composición elemental del AH.

2.2.5. Espectroscopia UV-visible

Los espectros UV-visible y las mediciones de absorbancia de soluciones de AH permiten obtener información respecto de su grado de humificación. Las medidas se realizaron sobre una solución del AH 25 mg L⁻¹ en NaHCO₃ 0,05 M, empleando un espectrofotómetro UV-visible Agilent 8453 con arreglo de diodos y una cubeta de cuarzo de 1 cm de paso óptico. El equipo utilizado tiene la ventaja de registrar el espectro de absorción en pocos segundos.

2.2.6. Espectroscopia Infrarroja

Los espectros IR del AH fueron determinados con un equipo NICOLET NEXUS FT-IR. Para ello se preparó la muestra liofilizada en pastilla de KBr al 1 %. Los espectros se registraron en el intervalo de números de onda 400-4000 cm⁻¹ y son el promedio de 32 barridos.

2.2.7. Medidas de potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de las moléculas de AH se midió en función del pH a fuerza iónica constante, con NaCl o CaCl₂ como electrolito, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Para ello 50 mL de una solución de AH 50 mg L⁻¹ se colocaron en un vaso de precipitado con NaCl o CaCl₂ (fuerza iónica = 0,01), el pH de la solución se ajustó a 10 con NaOH y se equilibró bajo

agitación continua (450 rpm). Una vez equilibrado, se realizó la medida del potencial zeta, el pH se disminuyó adicionando un pequeño volumen de HCl, y se tomó una nueva medida de potencial zeta luego de 10 min. Este procedimiento se repitió hasta alcanzar un pH igual a 2.

2.2.8. Isotermas de adsorción de calcio

Se realizaron isotermas de adsorción de iones calcio empleando medidas potenciométricas con un electrodo de ion selectivo (EIS). Esta metodología no requiere separación de fases, permite monitorear continuamente la actividad del ion en la fase acuosa y medir directamente concentraciones que difieren en órdenes de magnitud debido a la naturaleza logarítmica de la respuesta del electrodo. Se utilizó un electrodo selectivo de ion calcio de membrana líquida con intercambiador iónico orgánico (HANNA HI4004) y un electrodo de referencia de Ag/AgCl (HANNA HI5315) conectados a un equipo Altronix TPXIII. El rango nominal de concentraciones medibles con el electrodo es de $1,0$ a $3,0 \times 10^{-6}$ M, en un rango de pH de 4 a 10. Se realizó una calibración del electrodo en el rango $0,1$ a $1,0 \times 10^{-4}$ M. Las soluciones de calibración se obtuvieron por dilución de una solución de CaCl_2 $0,1$ M.

Las isotermas de adsorción de Ca al AH se realizaron bajo agitación continua (300 rpm) a pH 5, 7 y 9 en NaCl $0,01$ M. En todos los experimentos se adicionó 35 mL de una solución de AH 1 g L^{-1} a un tubo de 50 mL, y se reguló el pH al valor deseado. Luego se adicionó una solución de calcio $0,05$ M en pequeñas alícuotas sucesivas, a fin de cubrir un rango desde 0 a $2,4$ mM, y se registró la variación en la respuesta del electrodo selectivo, previo a cada nueva adición del ion. La cantidad de metal adsorbido al AH se calculó por diferencia entre la cantidad total adicionada y la concentración de metal medido en solución.

2.3. Resultados y discusión

2.3.1. Caracterización físico-química del suelo

Las propiedades físico químicas del suelo utilizado para la extracción de AH se muestran en la Tabla 2.1. De acuerdo al contenido de cada fracción

textural, se define como suelo de textura franca, lo cual se corresponde con los resultados hallados por Hevia et al (18) y Hepper et al (19) en otros trabajos realizados en la región de muestreo. Hepper et al (19) analizó además la mineralogía de la fracción arcilla en este tipo de suelos, e indica que esta mayormente representada por minerales amorfos, principalmente óxido de hierro y aluminio (20) (21), illitas y montmorrillonitas poco cristalizadas. El contenido de carbono se corresponde con los bajos contenidos de materia orgánica de regiones áridas y semiáridas, debido a la descomposición rápida de residuos (22).

Tabla 2.1. Propiedades físico químicas del suelo utilizado para la extracción del AH.

Fraciones texturales (%)	Arcilla 13, Limo 39, Arena 48
Carbono (%)	1,04
Nitrógeno (%)	0,09
pH	7,00
CIC (cmol_c Kg⁻¹)	19,40

2.3.2. Análisis elemental del AH

El análisis elemental proporciona información sobre la distribución de los elementos mayoritarios, carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno, y es la herramienta más comúnmente usada para la caracterización de los AH. Dada la complejidad de las moléculas, no es posible asignar una fórmula molecular a las mismas. Sin embargo, el análisis elemental permite establecer la eficiencia del proceso de extracción y purificación. Además es usualmente útil para distinguir SH de diferentes orígenes (23).

En la Tabla 2.2 se indica la proporción de cada elemento obtenida mediante los dos autoanalizadores, el porcentaje de cada elemento comúnmente encontrado para AH extraídos de suelo (2), así como también el contenido de cenizas del AH.

Tabla 2.2. Composición elemental de la muestra de AH determinada mediante el uso de dos autoanalizadores y valor promedio indicado en la literatura.

	Exeter	LECO	Valor promedio para AH (2)
		(%)	
Carbono	53,2	51,6	52,8 – 58,7
Hidrógeno	3,8		2,2 – 6,2
Oxígeno	39,1		32,8 – 38,3
Nitrógeno	3,9	3,3	0,8 – 4,3
Cenizas		2	

A partir de la composición elemental se derivan relaciones de elementos tales como hidrógeno/carbono (H/C), oxígeno/carbono (O/C), nitrógeno/carbono (N/C), utilizadas en los más variados estudios, tal como la evaluación de la dinámica de AH en compost (24) (25), determinación de la capacidad de formación de complejos metálicos (26), evaluación de prácticas de manejo de suelos (27) entre otras. La relación O/C es un indicador utilizado para identificar material húmico procedente de diferentes fuentes, ya sea, suelos, sedimentos o aguas. Mientras que la relación H/C está inversamente relacionada con el grado de condensación o aromaticidad de las moléculas (28). En la Tabla 2.3 se indican las relaciones atómicas obtenidas para el AH extraído de suelo, como así también los rangos de valores propuestos en bibliografía. Se observa que los valores obtenidos están en acuerdo con los valores de referencia mencionados para AH (2).

Tabla 2.3. Relaciones atómicas derivadas para el AH y valores de referencia obtenidos de la literatura.

	AH extraído	Relaciones atómicas de referencia (2)
H/C	0,07	0,04 – 0,12
O/C	0,74	0,56 – 0,73
C/N	14,5	12,3 – 73,4

2.3.3. Microscopía Electrónica de Barrido

Es muy poco probable que el tamaño y la forma de los AH observados por microscopía electrónica representen el tamaño y forma de estos materiales en el suelo, porque han sido disueltas y depositadas bajo condiciones diferentes a las de la formación de suelos (7). De todos modos, un conocimiento de la forma y tamaño de las partículas de AH luego de su extracción y un análisis por EDAX de la composición química de las mismas a nivel micrométrico, permite tener una idea más clara de las características del material estudiado y de su homogeneidad/heterogeneidad (4).

La Figura 2.3 muestra las micrografías SEM de la muestra sólida de AH tomadas a diferentes magnificaciones. Se observa que la misma está formada por partículas poliédricas relativamente grandes, con diversa cantidad de quiebres.

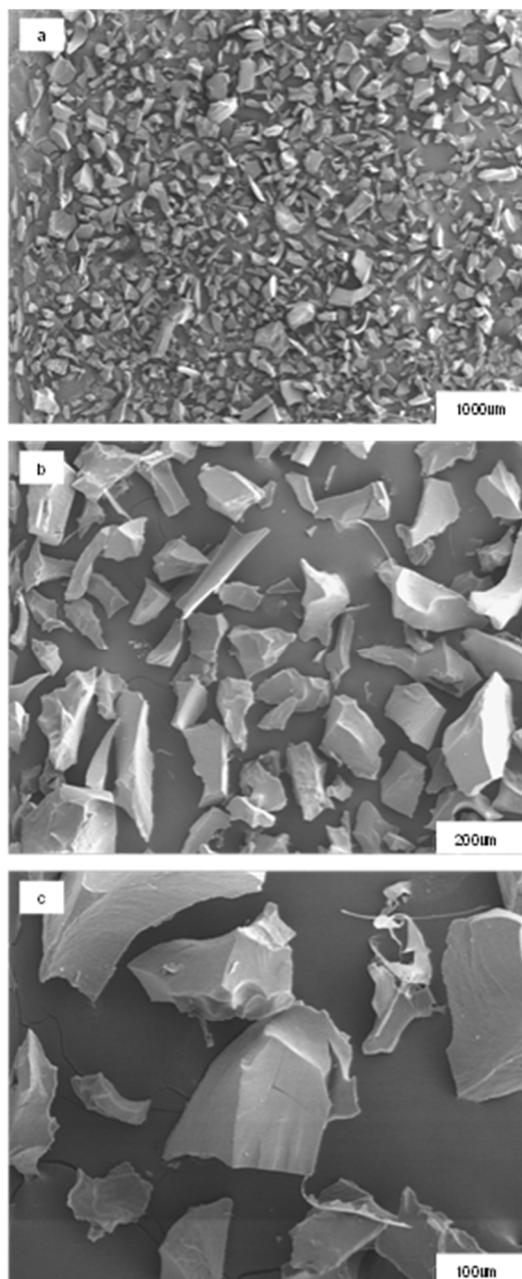


Figura 2.3. Micrografía SEM de las partículas de AH. Magnificación aproximada: (a) 20x, (b) 100x y (c) 200x.

La Figura 2.4 muestra un espectro EDAX típico de las partículas de AH mostradas en la Figura 2.3c. Se observa claramente la aparición de bandas asignadas a carbono y oxígeno, elementos característicos de los materiales húmicos. También se observan bandas asignables a elementos inorgánicos (principalmente potasio y sodio), que son impurezas que corresponden a reactivos utilizados en la extracción del AH o pueden provenir de los minerales del suelo. Es importante mencionar que el análisis por EDAX es sólo

semicuantitativo, por lo que se lo utiliza aquí para una identificación de los elementos presentes en la muestra y para tener información aproximada de la concentración de los mismos y de la homogeneidad/heterogeneidad de la muestra. En este sentido, varios espectros realizados a diferentes partículas de la muestra arrojaron los mismos resultados, demostrando homogeneidad en la composición química de las partículas.

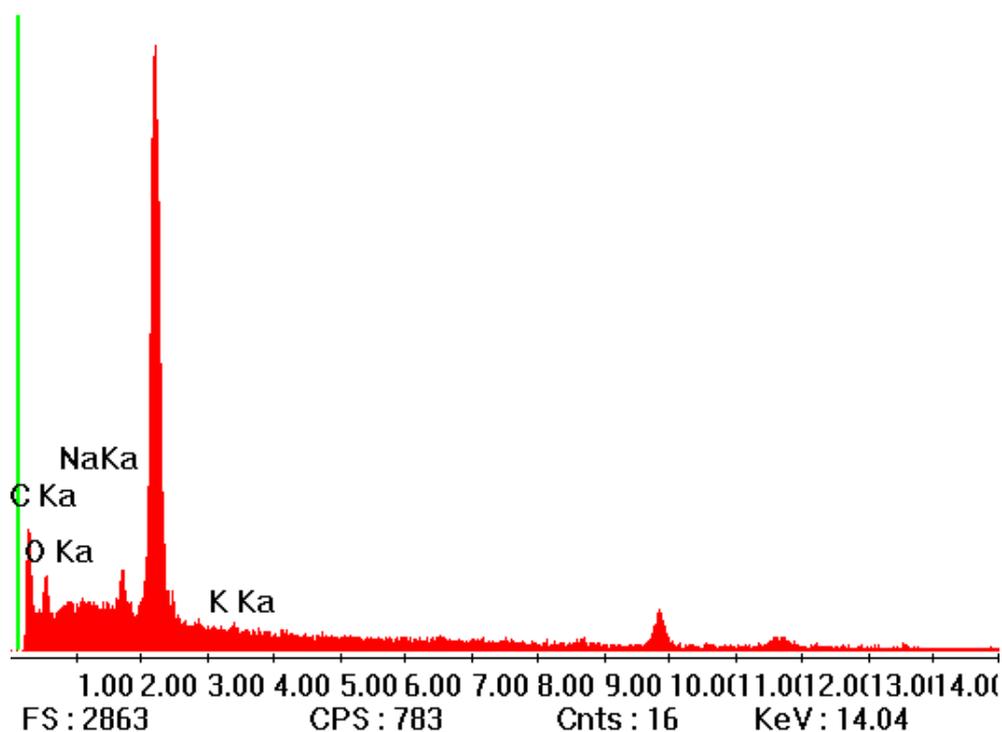


Figura 2.4. Espectro EDAX de partículas de AH, observadas en la Figura 2.3c.

2.3.3 Espectroscopia UV-visible

Los AH absorben radiación electromagnética en el rango UV y visible. Los espectros obtenidos no tienen picos de absorbancia característicos, sino que la misma disminuye de forma aproximadamente exponencial con el incremento de la longitud de onda. El espectro resulta de una mezcla de cromóforos, dentro de los cuales se encuentran grupos aromáticos, quinonas y estructuras conjugadas (2). El espectro de absorción del AH extraído del suelo se muestra en la Figura 2.5.

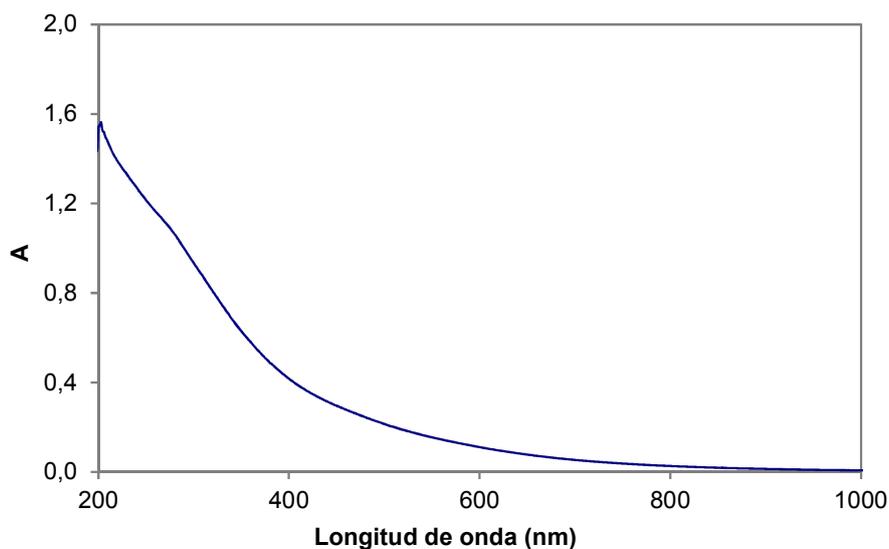


Figura 2.5. Espectro UV-visible de la muestra de AH.

Dada la complejidad de las moléculas de AH, la aplicación de la espectroscopia UV-visible no permite determinar los grupos funcionales de las moléculas. Sin embargo se utiliza ampliamente para obtener valiosa información a partir del empleo de relaciones de absorbancia, fundamentalmente en estudios de dinámica y caracterización de procesos de compostaje para determinar el grado de humificación (25) (29) (30), en la evaluación de diferentes prácticas de manejo de suelos (18) (31), monitoreo de calidad de aguas (32) e incluso en el desarrollo de nano partículas con adsorbentes biocompatibles para aplicaciones farmacéuticas (33). Además la espectroscopia UV-visible permite determinar la concentración de AH disueltos a partir del empleo de la ley de Beer (13).

Chin et al (34) determinaron la absortividad molar a 280 nm de varias muestras de húmicos. Esta longitud de onda se eligió debido a que las transiciones electrónicas $\pi-\pi^*$ ocurren en esa región del UV para sustancias fenólicas, derivados de anilina, ácidos benzoicos, polienos e hidrocarburos aromáticos policíclicos, los cuales son precursores o componentes de SH. Observaron tendencias entre las propiedades espectroscópicas y las características estructurales de las SH, las cuales han sido ampliamente citadas en la literatura (31) (32) (35). Tal es el caso de la relación entre la aromaticidad de las moléculas de AF y la absortividad molar a 280 nm, $\epsilon_{280\text{nm}}$, que se indica en la Ecuación 2.1:

$$\text{Aromaticidad} = 0,05 \varepsilon_{280\text{nm}} + 6,74$$

Ecuación 2.1

Además, Chin et al (34) observaron una relación semi-predictiva entre la absorptividad molar a 280 nm y el peso molecular promedio de SH determinado por HPSEC (High Pressure Size Exclusion Chromatography), representada por la Ecuación 2.2:

$$M = 3,99 \varepsilon_{280\text{nm}} + 490$$

Ecuación 2.2

Dado que tanto el peso molecular como la aromaticidad son propiedades importantes para determinar la reactividad del carbono orgánico en procesos como el transporte de compuestos orgánicos hidrofóbicos, estas relaciones pueden proveer un estimador útil para la reactividad de las SH en tales procesos.

Es de notable difusión el uso de relaciones de absorbancias para la caracterización de SH. La relación de absorbancias a 465 nm y a 665 nm (E_4/E_6) y la relación de absorbancias a 250 y a 365 nm (E_2/E_3) se usan como indicadores del grado de humificación cuya magnitud es inversamente proporcional al grado de condensación y al peso molecular (36). Sin embargo el uso de estas relaciones es controversial (37) (9). La correlación de E_4/E_6 y E_2/E_3 con el contenido de carbono aromático condensado en una muestra de SH es bastante pobre, y estas relaciones no siempre se corresponden con el peso molecular (38). Se ha demostrado que los valores de E_4/E_6 varían considerablemente con la concentración de AH (39), con el pH, con la fuerza iónica y con la presencia y cantidad de metales (40). Peuravuori y Pihlaja (41) encontraron una correlación lineal entre la relación E_2/E_3 y $\varepsilon_{280\text{nm}}$ y E_2/E_3 y la aromaticidad de las SH, donde $\varepsilon_{280\text{nm}}$ y la aromaticidad disminuyen con el incremento de los valores E_2/E_3 . Dicha correlación está representada por la Ecuación 2.3:

$$\varepsilon_{280\text{nm}} = 3689 - 1232 \frac{E_2}{E_3}$$

Ecuación 2.3

En la Tabla 2.4 se muestran los parámetros espectroscópicos obtenidos y las relaciones calculadas para la muestra de AH empleada en este trabajo.

Tabla 2.4. Parámetros espectroscópicos y relaciones calculadas para la muestra de AH.

$\epsilon_{280 \text{ nm}}$	990,92
E_2/E_3	2,19
E_4/E_6	3,87
Aromaticidad %	56
Masa Molecular	$4,4 \times 10^3$

2.3.4 Espectroscopia Infrarroja

La absorción de radiación infrarroja (IR) por la materia corresponde a transiciones vibracionales y rotacionales en el material. La espectroscopia IR brinda información sobre la presencia de grupos funcionales específicos dentro de las moléculas. Los espectros IR típicos de SH son relativamente simples, con pocas bandas muy amplias. Esta simpleza es sólo aparente, dado que las bandas amplias resultan de la superposición de una mezcla compleja de bandas correspondientes a grupos funcionales que se encuentran en diferentes ambientes químicos, con diferentes intensidades de enlace (13).

En la Figura 2.6 se muestra el espectro IR obtenido para la muestra de AH. Se observan bandas de absorción características de grupos funcionales de AH (9): 3414 cm^{-1} (tensión OH debida a puente hidrógeno), $2922\text{-}2844 \text{ cm}^{-1}$ (vibración del enlace C-H alifáticas en unidades CH_2 o CH_3), 1716 cm^{-1} (vibración C=O de grupos COOH), 1616 cm^{-1} (doble enlace C=C de grupos conjugados con C=O o COO^-), 1404 cm^{-1} (flexión de grupos C-H alifáticos, y O-H alcohólicos y carboxílicos), 1244 cm^{-1} (flexión C-O y O-H debido a grupos carboxilo). No se observan bandas características de la vibración Si-O a 1050 y 850 cm^{-1} lo que permite corroborar, junto a la determinación de cenizas (2%), el bajo porcentaje de impurezas en la muestra de AH.

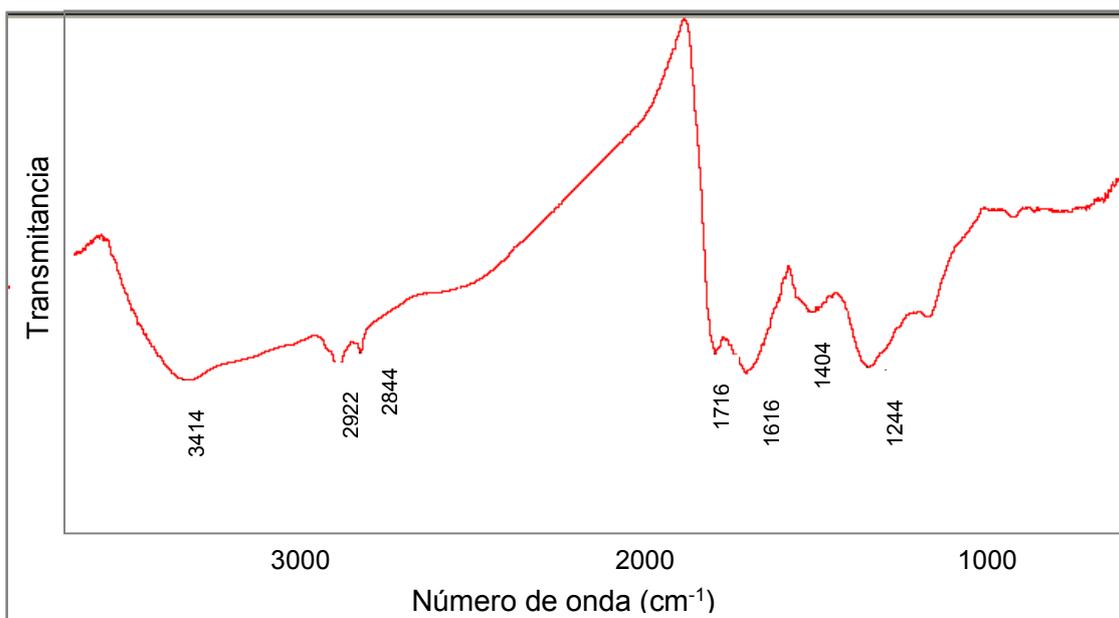


Figura 2.6. Espectro IR obtenido para la muestra de AH.

2.3.5 Medidas de potencial zeta (ζ)

La Figura 2.7 muestra el efecto del pH sobre el potencial zeta de la muestra de AH en soluciones de NaCl y CaCl₂. El potencial zeta es negativo a cualquier valor de pH en ambos electrolitos. En NaCl, el potencial zeta es -20 mV a pH 2, disminuye hasta -37 mV a pH 5 y luego permanece casi constante hasta pH 10. Este comportamiento es casi coincidente con el reportado por Hosse y Wilkinson (42) para dos muestras de AH. La disminución en el potencial zeta desde pH 2 a 5 resulta de la deprotonación de grupos carboxílicos principalmente (36) (43), lo cual genera cargas negativas en las moléculas de AH. Aunque las moléculas experimentan una posterior deprotonación a valores de pH más altos debido a la presencia de otros grupos ionizables, tales como grupos fenólicos, el potencial zeta no cambia significativamente a pH alto, es decir que es poco sensible al incremento de carga a densidad de carga alta (44). En CaCl₂, el potencial zeta es siempre menos negativo que en NaCl y permanece en alrededor de -15 mV a todos los valores de pH estudiados. Las diferencias observadas en los valores de potencial zeta entre CaCl₂ y en NaCl resultan del enlace de iones calcio a las moléculas de AH, lo cual se ha demostrado en muchas publicaciones (45) (46).

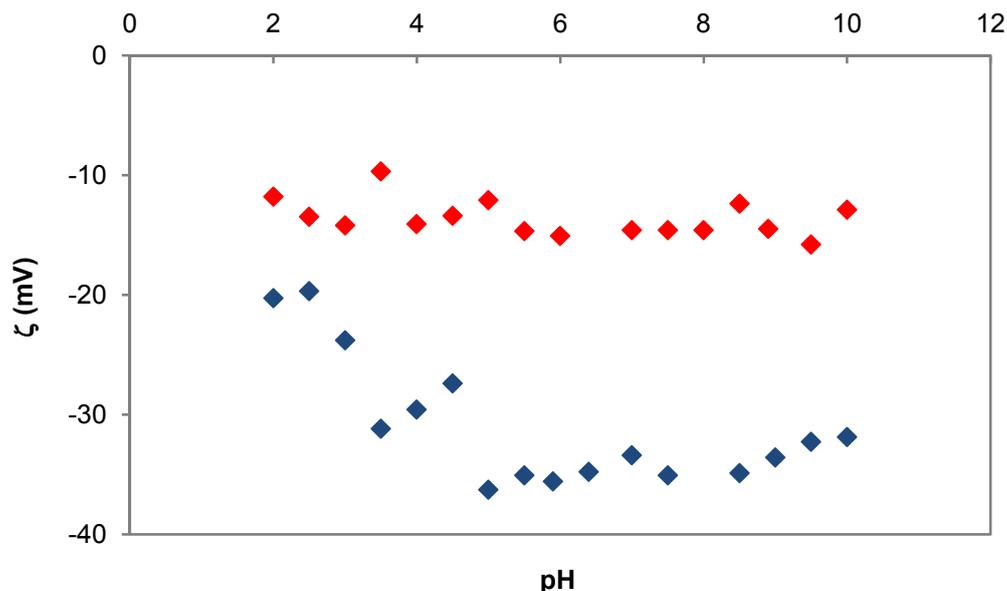


Figura 2.7. Efecto del pH sobre el potencial zeta del AH en NaCl (◆) y en CaCl₂ (◆) (FI=0,01).

2.3.6. Isotermas de adsorción de calcio al AH

Los AH presentes en aguas, suelos y sedimentos pueden enlazar iones metálicos e iones H⁺. Una descripción del enlace de iones metálicos y H⁺ a los AH permite analizar las fuentes de acidez y alcalinidad en aguas, y analizar la capacidad buffer de metales de suelos y sedimentos (47).

Se consideran tres aspectos importantes en el enlace de iones a los AH: 1) carga y potencial variable de las moléculas de AH, 2) heterogeneidad química de los sitios de enlace y 3) competencia de los distintos iones por los mismos sitios reactivos en las moléculas de AH.

En la Figura 2.8 se indica la respuesta del electrodo selectivo de calcio (mV) en función del log de la concentración de calcio utilizando el valor promedio obtenido de los diferentes pH. Se obtuvo una respuesta lineal en el rango de concentraciones estudiado (r^2 0,9995). Se calculó la pendiente del electrodo, arrojando un valor apropiado igual a 26 mV, siendo que el valor recomendado por el fabricante es de 26 ± 4 mV.

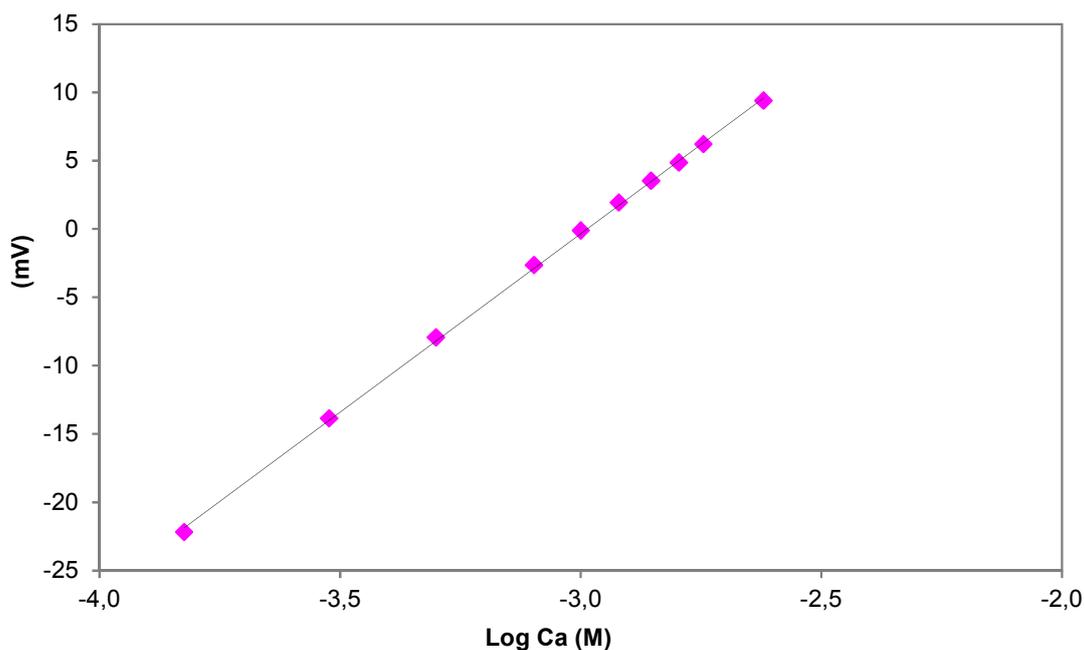


Figura 2.8. Curva de calibración del electrodo de ion selectivo para calcio. Los puntos son valores promedio de las lecturas obtenidas a pH 5, 7 y 9.

La Figura 2.9a muestra las isotermas de adsorción de calcio al AH a los tres valores de pH estudiados. La Figura 2.9b muestra las mismas isotermas de adsorción graficadas de forma logarítmica, tal como suelen presentarse para adsorción de cationes a SH. La forma de las isotermas está en acuerdo con otros trabajos publicados en la literatura (2) (44) (45). Ninguna de las isotermas alcanza un valor máximo o una meseta. Además, la pendiente poco pronunciada que se observa en las isotermas graficadas de forma logarítmica provee evidencia de que los sitios de enlace en los AH son heterogéneos (2). Milne et al (47) sugieren que los grupos carboxílicos (-COOH) dominan el enlace de iones calcio y cadmio a los AH, y que dichos cationes no son capaces de competir con los H⁺ por el enlace a los grupos fenólicos (-OH). Dada la naturaleza de los sitios de enlace, es de esperar que la cantidad de iones calcio enlazado varíe con el pH de la solución. En la Figura 2.9b se observa que la cantidad de calcio enlazado aumenta con el aumento del pH desde 5 a 9, lo cual fue observado por varios autores para el enlace de metales a húmicos (47) (45) (9). La dependencia del enlace es consistente con la competencia entre los cationes metálicos y los protones por los sitios de enlace. A pH bajo una mayor concentración de protones están disponibles en

solución para competir con los cationes calcio y se produce una menor adsorción del metal. A pH elevado, los grupos carboxílicos y fenólicos están disociados y una menor concentración de protones en solución favorece la adsorción del metal.

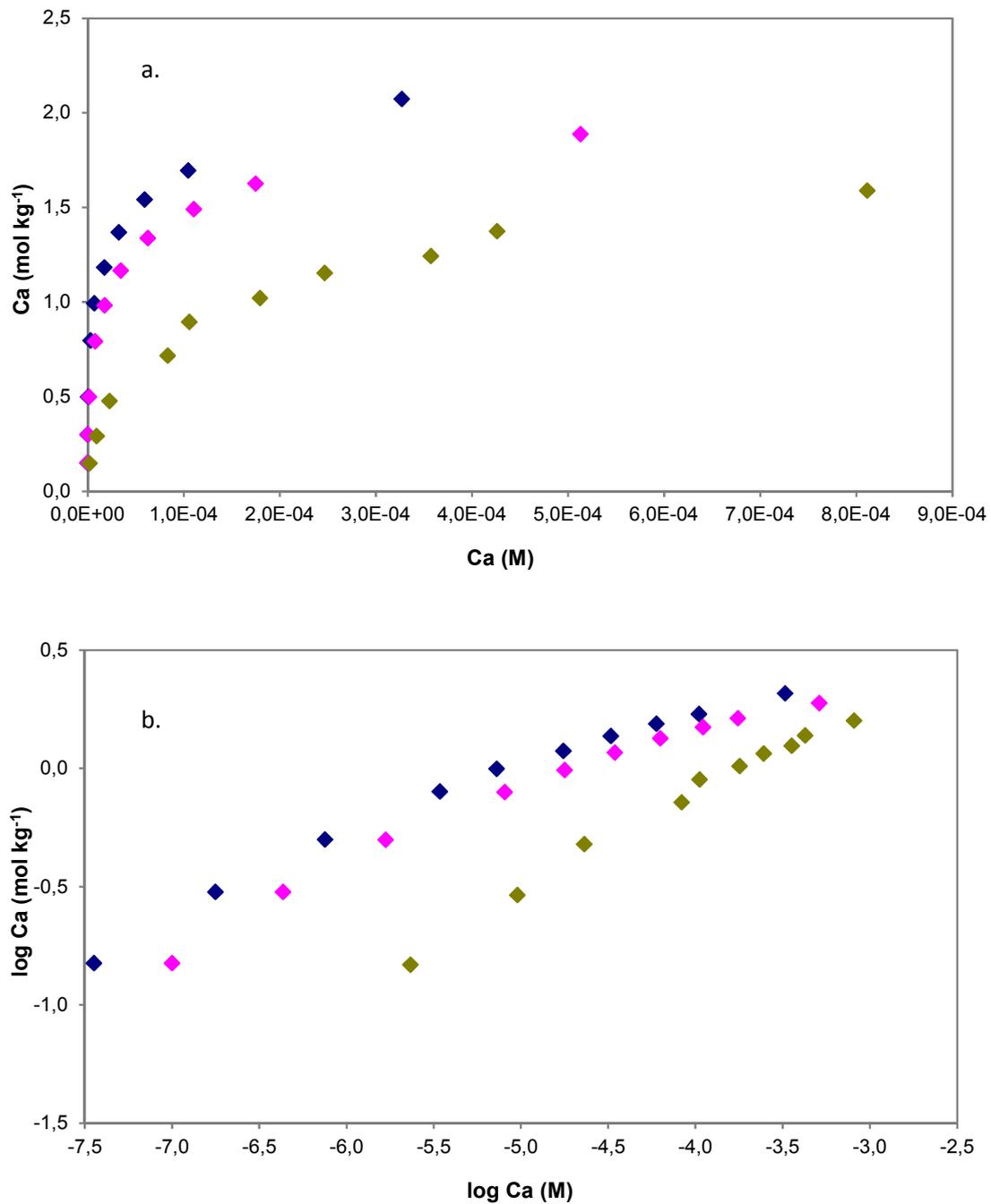


Figura 2.9. a) Isotermas de adsorción de calcio a AH a pH 5 (◆), 7 (◆) y 9 (◆). b) Representación logarítmica de las isotermas de adsorción mostradas en la Figura a).

2.4. Conclusiones

A partir del empleo de varias técnicas de caracterización se corroboró que la muestra de AH utilizada en este estudio presenta propiedades químicas similares a otros AH reportados en la bibliografía. El conocimiento de su composición elemental, grupos funcionales y desarrollo de carga es de suma importancia para interpretar el estado de agregación que presentan los mismos en el ambiente como también su interacción frente a cationes metálicos, contaminantes y a otros componentes del suelo. Tales propiedades serán evaluadas en los capítulos 4 y 5.

2.5. Bibliografía

1. Porta Casanellas J, Lopez-Acevedo Reguerín M, Roquero De Laburu C. 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. pp 848.
2. Tipping E. 2002. Cation Binding by Humic Substances. Cambridge University. New York. pp 434.
3. Hayes MHB & Clapp CE. 2001. Humic substances: considerations of compositions, aspects of structure, and environmental influences. *Soil Sci.* 166(11):723-737.
4. Clapp CE & Hayes MHB. 1999. Sizes and shapes of humic substances. *Soil Sci.* 164(11):777-789.
5. Swift RS. 1999. Macromolecular properties of soil humic substances. Fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* 164(11):790–802.
6. Conte P & Piccolo A. 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33:1682–1690.
7. Wershaw RL & Aiken GR. 1985. Chapter 15. Molecular size and weight measurements of humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment and water*. Ed. Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp 477-492.
8. Sutton R & Sposito G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39:9009–9015.
9. Molina F V. 2014. *Soil Colloids properties and ion binding*. CRC Press. pp 545.
10. Chilom G & Rice JA. 2009. Organo-clay complexes in soils and sediments. En: *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Ed. Senesi N, Xing B, Min Huang P. John Wiley. New Jersey. pp.111-133.
11. MacCarthy P. 2001. The principles of humic substances. *Soil Sci.* 166(11):738-751.
12. Swift RS. 1996. Chapter 35: Organic matter characterization. En: *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Ed. Sparks DL. Soil Sci. Soc. Am. Madison WI. pp.1018-1020.
13. MacCarthy P & Rice JA. 1985. Spectroscopic methods (other than NMR) for determining functionality in humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment and water*. Ed. Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp.527-559.
14. INTA, Gobierno de La Pampa, UNLPam. 1980. *Inventario integrado de los recursos naturales de la Provincia de La Pampa*. Ediciones INTA. Buenos Aires. pp.493.

15. Bouyoucos GJ. 1962. Hydrometer method for making particle size analysis soils. *Agronomy Journal*. 54:464-465.
16. Bremner JM. 1996. Nitrogen Total. En: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Ed. Sparks DL. Soil Sci. Soc. Am. Madison WI. pp.1149-1176.
17. Sumner ME & Miller WP. 1996. Cation exchange capacity and exchange coefficients. En: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Ed. Sparks DL. Soil Sci. Soc. Am. Madison WI. pp.1201-1230.
18. Hevia GG, Buschiazco DE, Hepper EN, Urioste AM, Anton EL. 2003. Organic matter in size fractions of soils of the semiarid Argentina. Effects of climate, soil texture and management. *Geoderma*. 116:265-277.
19. Hepper EN, Buschiazco DE, Hevia GG, Urioste A, Antón L. 2006. Clay mineralogy, cation exchange capacity and specific surface area of loess soils with different volcanic ash contents. *Geoderma*. 135:216-223.
20. Buschiazco DE, Aimar SB, Stahr K. 1995. Factores que afectan la estabilidad estructural de suelos de la Región Semiárida Pampeana Central (Argentina). *Ciencia del Suelo*. 13:66-69.
21. Iturri LA & Buschiazco DE. 2014. Cation exchange capacity and mineralogy of loess soils with different amounts of volcanic ashes. *Catena*. 121:81-87.
22. Quiroga AR, Buschiazco DE, Peinemann N. 1999. Soil compaction is related to management practices in the semi-arid Argentine pampas. *Soil & Tillage Research*. 52:21-28.
23. Huffman EWD & Stuber HA. 1985. Analytical methodology for elemental analysis of humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment and water*. Ed. Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp.433-456.
24. Fernández JM, Senesi M, Plaza G, Brunetti G, Polo A. 2009. Effects of Composted and Thermally Dried Sewage Sludges on Soil and Soil Humic Acid Properties. *Pedosphere*. 19:281-291.
25. Campitelli P & Ceppi S. 2008. Effects of composting technologies on the chemical and physicochemical properties of humic acids. *Geoderma*. 144:325-333.
26. Dudare D & Klavins M. 2013. Complex-forming properties of peat humic acids from a raised bog profiles. *Journal of Geochemical Exploration*. 129:18-22.
27. Xuejun Guo, Wei Du, Xuan Wang, Zhifeng Yang. 2013. Degradation and structure change of humic acids corresponding to water decline in Zoige peatland, Qinghai-Tibet Plateau. *Sci. Total Environ*. 445-446:231-236.
28. Steelink C. 1985. Chapter 18. Implications of elemental characteristics of humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment and water*. Ed. Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp.457-476.

29. Morán Vieyra FE, Palazzi VI, Sanchez de Pinto MI, Borsarelli CD. 2009. Combined UV–Vis absorbance and fluorescence properties of extracted humic substances-like for characterization of composting evolution of domestic solid wastes. *Geoderma*. 151:61-67.
30. Fukushima M, Yamamoto K, Ootsuka K, Komai T, Aramaki T, Ueda S, Horiya S. 2009. Effects of the maturity of wood waste compost on the structural features of humic acid. *Bioresource Technology*. 100:791-797.
31. Vergnoux A, Di Rocco R, Domeizel M, Guiliano M, Doumenq P, Théraulaz F. 2011. Effects of forest fires on water extractable organic matter and humic substances from Mediterranean soils: UV–vis and fluorescence spectroscopy approaches. *Geoderma*. 60:434-443.
32. Uyguner CS & Bekbolet M. 2005. Implementation of spectroscopic parameters for practical monitoring of natural organic matter. *Desalination*. 176:47-55.
33. Tóth IY, Szekeres M, Turcu R, Sáringher S, Illés E, Nesztor D, Tombácz E. 2014. Mechanism of in Situ Surface Polymerization of Gallic Acid in an Environmental-Inspired Preparation of Carboxylated Core–Shell Magnetite Nanoparticles. *Langmuir*. 30(51):15451–15461.
34. Chin YP, Aiken G, O'Loughlin E. 1994. Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. & Technol*. 28:1853-1858.
35. Richard C, Coelho C, Guyot G, Shaloiko L. 2011. Fluorescence properties of the b5 kDa molecular size fractions of a soil humic acid. *Geoderma*. 163:24-29.
36. Chen Y, Senesi N, Schnitzer M. 1977. Information provided on humic substances by E2/E3 ratio. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41:352-358.
37. Martin- Neto L, Milori DMBP, Da Silva WTL, Simões ML. 2009. EPR, FTIR, RAMAN, UV – visible absorption, and fluorescence spectroscopies in studies of NOM. En: *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. Ed. Senesi N, Xing B, Min Huang P. John Wiley. New Jersey. pp.652-675.
38. Piccolo A. 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Sci*. 166(11):810-832.
39. Summers RS, Cornel PK, Roberts PV. 1987. Molecular size distribution and spectroscopic characterization of humic substances. *Sci. Total Environ*. 65:27-37.
40. Stevenson FJ. 1994. *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*. John Wiley. New York. pp.426.
41. Peuravuori J & Pihlaja K. 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 337:133-149.
42. Hosse M & Wilkinson KJ. 2001. Determination of Electrophoretic Mobilities and Hydrodynamic Radii of Three Humic Substances as a Function of pH and Ionic Strength. *Environ. Sci. Technol*. 35:4301-4306.

43. Alvarez-Puebla RA & Garrido JJ. 2005. Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states. *Chemosphere*. 59:659-667.
44. Attard P, Antelmi D, Larson I. 2000. Comparison of the zeta potential with the diffuse layer potential from charge titration. *Langmuir*. 16:1542–1552.
45. Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Koopal LK, Borkovec M, Benedetti MF, Avena MJ. 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 151:147-156.
46. Majzik A & Tombácz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions II. Colloidal interactions: charge state, dispersing and/or aggregation of particles in suspension. *Org. Geochem*. 38:1330–1340.
47. Milne CJ, Kinniburgh DG, De Wit JCM, van Riemsdijk WH, Koopal LL. 1995. Analysis of metal-ion binding by a peat humic acid using a simple electrostatic model. *Journal of Colloid and Interface Science*. 175:448-460.

Capítulo 3. Extracción y Caracterización de la Fracción Arcilla del Suelo

3.1. Introducción

El término arcilla lleva varias connotaciones, que no son mutuamente consistentes (1). En el lenguaje diario, se refiere a un suelo que tiende a retener agua y se vuelve suave y maleable luego de humedecerse. En el contexto de la textura del suelo, se designa arcilla a un rango de tamaño de partículas, $< 2 \mu\text{m}$, por lo que muchas de las arcillas del suelo se consideran coloides, es decir, material finamente dividido que tiende a dispersarse dentro de un líquido y exhibe una gran superficie específica (2). Finalmente, en un sentido mineralógico, las arcillas son un grupo particular de minerales, pertenecientes a la clase de los filosilicatos, muchos de los cuales están presentes en la fracción arcilla del suelo (3).

En este trabajo se plantea como objetivo de los capítulos 5 y 6 el estudio de la interacción de los AH con la fracción arcilla de un suelo. Por lo tanto, al mencionar la fracción arcilla, estamos refiriendo a la segunda definición, es decir, en el contexto de la textura del suelo la fracción $< 2 \mu\text{m}$.

Los componentes inorgánicos más abundantes en la fracción arcilla de suelos de regiones semiáridas, tal como la Región Semiárida Pampeana, son los minerales de la clase de los filosilicatos, que pueden ser laminares o amorfos, y en menor proporción los óxidos e hidróxidos de hierro, aluminio, titanio y manganeso (4) (5) (6). Se ha publicado recientemente la presencia de cuarzo en la fracción de limos gruesos ($>20 \mu\text{m}$) de estos suelos, pero no en la fracción arcilla (7)

3.1.1. Filosilicatos

Los minerales de arcilla formados por láminas se denominan silicatos laminares o filosilicatos. Los filosilicatos son minerales que tienen una gran influencia en las propiedades químicas y físicas de los suelos y sedimentos debido a que generalmente presentan un pequeño tamaño de partícula, elevada área superficial y propiedades de intercambio catiónicas (8) (9).

Las unidades principales en la formación de los filosilicatos en la fracción arcilla son disposiciones de tetraedros de silicio-oxígeno $(\text{SiO}_4)^{4-}$ y disposiciones de octaedros de aluminio o magnesio con oxhidrilos, $\text{Al}_2(\text{OH})_6$ o $\text{Mg}_3(\text{OH})_6$. En la Figura 3.1 se observan estas unidades básicas, tetraedro y octaedro. Las uniones de tetraedros, todos en un mismo plano, generan lo que

se denomina una capa de tetraedros o capa tetraédrica (T). Las uniones de los octaedros en un plano, por otra parte, dan origen a lo que se conoce como capa de octaedros o capa octaédrica (O).

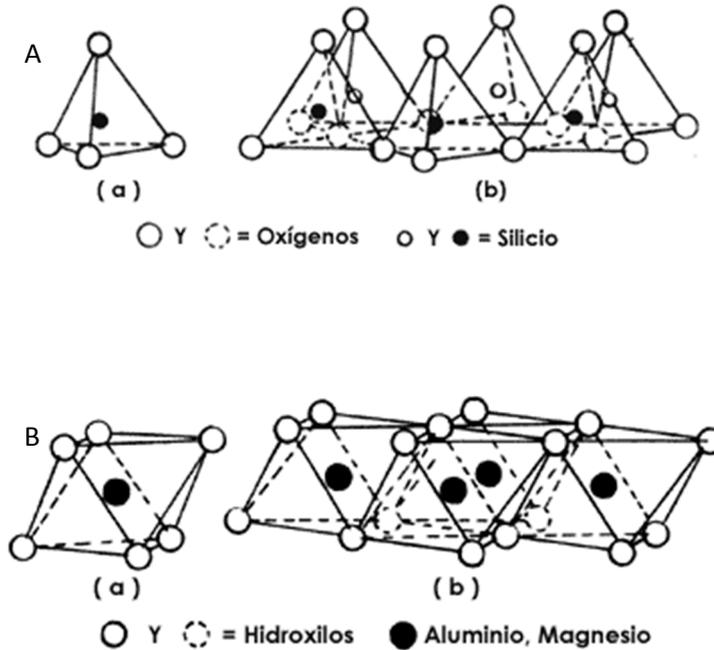


Figura 3.1. A: a) tetraedro de silicio simple, b) tetraedros unidos formando la capa tetraédrica. B: a) octaedro de aluminio simple, b) octaedros unidos formando la capa octaédrica (6).

Las diferentes maneras de unión entre las capas tetraédricas y octaédricas dan lugar a los diferentes filosilicatos. Una capa tetraédrica unida a una octaédrica caracteriza a los filosilicatos tipo 1:1 o T-O, mientras que una capa octaédrica unida a uno y otro lado a una capa tetraédrica da por resultado una estructura 2:1 o T-O-T, tal como se indica en la Figura 3.2. Estas uniones de dos o tres capas constituyen lo que se denomina lámina. El término lámina deriva del aspecto que poseen estas estructuras. El espesor (a lo largo del eje de coordenadas z, por ejemplo) de una lámina del tipo 1:1 es de alrededor de 7,2 Å, mientras que el de una lámina del tipo 2:1 es de alrededor de 10 Å (1) (6). Estas dimensiones son mucho menores que las que una lámina de mineral de arcilla posee en los otros dos ejes de coordenadas (x e y, por ejemplo), que pueden llegar a ser del orden de los micrómetros, lo que le da un aspecto laminar a estas estructuras.

Las láminas generalmente se asocian entre ellas apilándose cara a cara, dejando entre lámina y lámina un espacio interlaminar o, directamente, interlámina. Este espacio interlaminar es variable en espesor y aloja generalmente moléculas de agua e iones provenientes del medio en que las arcillas están inmersas (6).

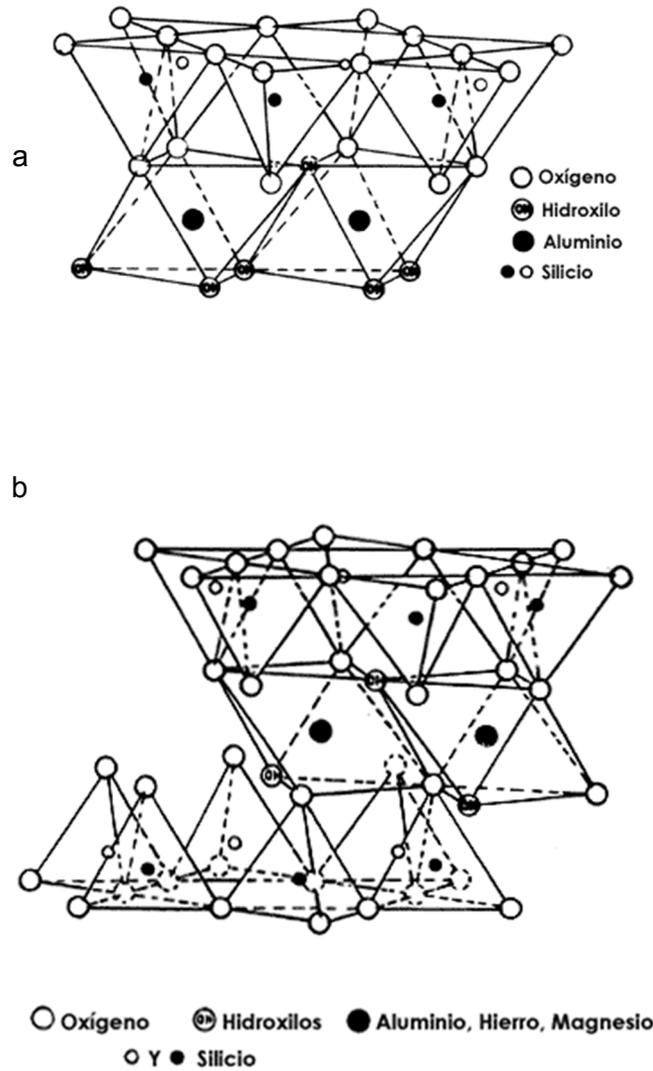


Figura 3.2. a) estructura de una lámina 1:1, b) estructura de una lámina 2:1 (6)

La estructura descrita es una estructura ideal. Típicamente ocurren sustituciones isomórficas tanto en la capa tetraédrica como en la octaédrica. Estas sustituciones isomórficas ocurren cuando algunos cationes de la red cristalina (por ejemplo Si(IV) o Al(III)) están reemplazados por cationes de

menor valencia. Los casos más frecuentes de sustitución isomórfica son el de Al(III) por Si(IV) en la capa tetraédrica, y el de Mg(II) o Fe(II) en lugar de Al(III) en la capa octaédrica. La sustitución resulta en un ion de menor valencia que entra en lugar de otro de mayor valencia, dando lugar a una carga eléctrica negativa y permanente en la estructura cristalina (4) (6).

La carga neta negativa que se genera dentro de la estructura cristalina de las láminas debe ser contrabalanceada por cargas eléctricas positivas para mantener la electroneutralidad del sistema. De hecho, en los minerales arcillosos la carga estructural negativa es compensada externamente por la adsorción de cationes desde la solución que está en contacto con la arcilla. Estos iones tienden a concentrarse cerca de la superficie externa de las partículas y penetran también en el espacio interlamilar. Los cationes adsorbidos, típicamente Na(I), K(I), H(I), Mg(II), Ca(II) y Al(III), no son una parte integral de la estructura laminar, sino que pueden ser reemplazados o intercambiados por otros cationes de la solución. El proceso de intercambio catiónico es de gran importancia en los suelos y sedimentos porque afecta la retención y liberación de nutrientes así como los procesos de floculación y dispersión de coloides (1) (10). Una medida de la carga neta negativa de la red cristalina de los minerales y los sistemas que los contienen es la capacidad de intercambio catiónico (CIC), que justamente cuantifica los cationes que pueden ser intercambiados (11).

Además de cargas estructurales negativas, los bordes de la láminas poseen grupos superficiales que pueden protonarse o desprotonarse para generar cargas positivas o negativas superficiales (12) (13). Esta carga es variable y dependiente del pH.

Los silicatos laminares comúnmente encontrados en la fracción arcilla de los suelos de la Región Semiárida Pampeana, tal como el utilizado en este trabajo de tesis, son esmectitas pobremente cristalinas e illitas con trazas de caolinitas (7). Por lo se detallan en particular algunas propiedades de estos silicatos laminares a continuación.

Las esmectitas son minerales de tipo 2:1 que presentan sustituciones isomórficas en su estructura, dando origen a diferentes especies minerales. La montmorillonita es la arcilla más importante dentro del grupo de las esmectitas. La fórmula estructural ideal de la montmorillonita es

$\text{Ca}_{0,36}(\text{Si}_{7,5}\text{Al}_{0,5})(\text{Al}_{2,37}\text{Fe}_{0,75}\text{Mg}_{1,21})\text{O}_{20}(\text{OH})_4$ (14). Lo cual indica que existen sustituciones isomórficas de Si(IV) por Al(III) en la capa tetraédrica y de Al(III) por Mg(II) y Fe(III) en la capa octaédrica. Por lo tanto existe un exceso de carga negativa en la estructura que se calcula en -0,72 por celda unidad. Esta carga negativa se encuentra balanceada por la presencia de cationes intercambiables como el Na(I), Mg(II) y Ca(II) que se ubican en el espacio interlaminar formando complejos de esfera externa. La propiedad destacable de este grupo es su capacidad de expansión y contracción en procesos de humedecimiento y secado. Esto se debe a que su estructura posibilita la hidratación de cationes interlaminares provocando la separación de las láminas. La CIC de las esmectitas es alta, su valor se halla en el intervalo de 0,8 a 1,5 meq g⁻¹ y tienen una elevada superficie específica (4).

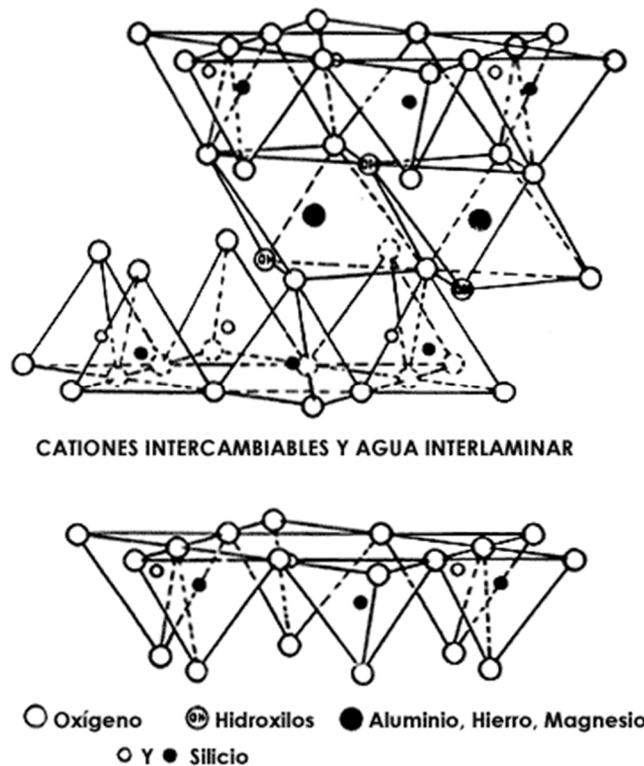


Figura 3.3. Esquema de la estructura de la montmorillonita.

Las illitas son también minerales del tipo 2:1, pertenecientes al grupo de las arcillas micáceas. La fórmula estructural se representa como $\text{K}_{0,7}(\text{Si}_{3,5}\text{Al}_{0,5})(\text{Al}_{1,6}\text{Fe}_{0,2}\text{Mg}_{0,2})\text{O}_{10}(\text{OH})_2$ (14). La sustitución isomórfica ocurre en la capa tetraédrica principalmente, a diferencia de la sustitución en la capa

octaédrica que ocurre en las esmectitas, originando una alta densidad de cargas negativas en estas láminas. Iones potasio son atraídos y fijados entre láminas adyacentes, y como consecuencia las propiedades de expansión contracción se encuentran disminuidas. Además, el potasio adsorbido bloquea los puntos de intercambio catiónico, y la CIC es del orden de 0,1 a 0,4 meq g⁻¹, bastante menor de lo que se esperaría considerando las sustituciones isomórficas (6). Un esquema de la estructura de las illitas se muestra en la Figura 3.4.

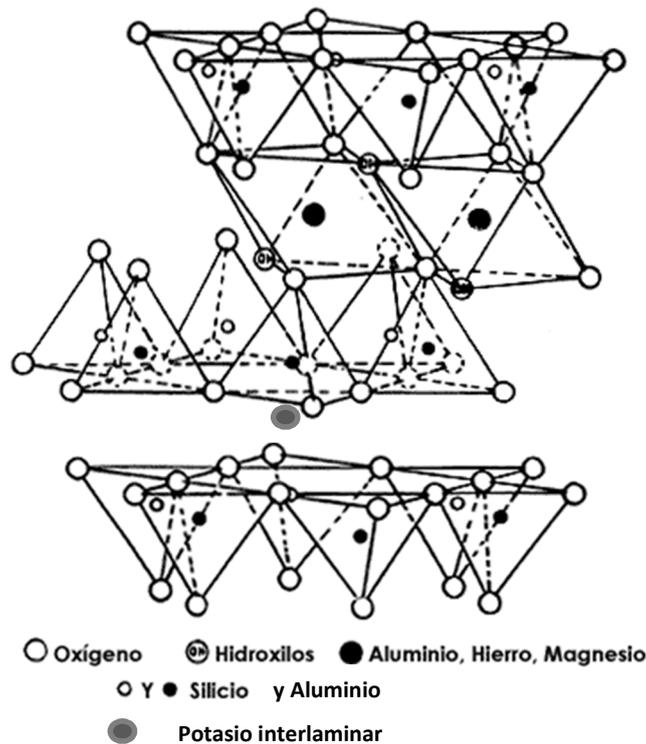


Figura 3.4. Esquema de la estructura de la illita.

La caolinita es el mineral más común dentro del tipo de minerales 1:1. Es un aluminosilicato, con una capa tetraédrica unida a una capa octaédrica, en la que dos de cada tres octaedros están ocupados por aluminio. Su fórmula estructural ideal es $Al_2Si_2O_5(OH)_4$ (14). No presenta sustituciones isomórficas significativas, por lo que la CIC ideal debería ser cercana a cero, aunque muestras reales poseen CIC bajas pero cuantificables de 0,01 a 0,1 meq g⁻¹. En general, una buena parte de las cargas eléctricas que portan las partículas de caolinita corresponden a cargas variables en función del pH del medio

debido a protonación-desprotonación de grupos superficiales. Un esquema de la estructura de la caolinita se indica en la Figura 3.5.

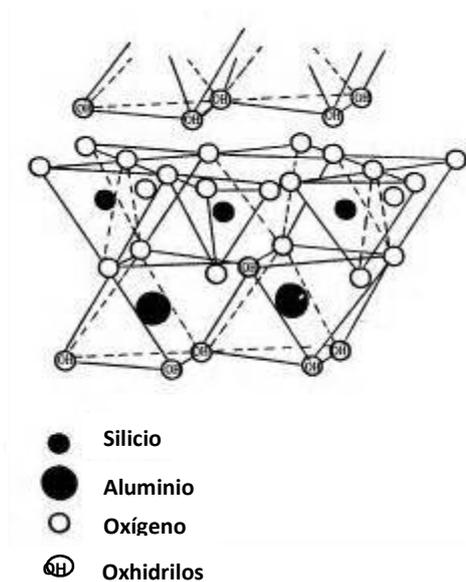


Figura 3.5. Esquema de la estructura de la caolinita.

3.1.2. Óxidos.

La liberación de aluminio, hierro, manganeso, titanio y silicio como resultado de los procesos de meteorización conduce a la neoformación de óxidos, hidróxidos y oxihidróxidos en el suelo. Estos actúan como elementos cromógenos en suelos, a los que confieren distintos colores según su estado de oxidación y grado de hidratación. Pueden presentarse asociados a las arcillas, o actuando como cementantes de agregados de suelo (6).

Los óxidos e hidróxidos más abundantes en los suelos de regiones semiáridas son aquellos derivados de hierro, aluminio, titanio y manganeso. La gibbsita ($\text{Al}_2(\text{OH})_6$) es el hidróxido de aluminio más abundante en los suelos. Es la forma de hidróxido de aluminio estable a baja temperatura. Los óxidos de hierro más comunes en los suelos son la hematita (Fe_2O_3) y la goetita (FeOOH), también es frecuente la presencia de magnetita (Fe_3O_4), un óxido de hierro derivado de la roca madre (15). Por último, entre los óxidos de titanio que se encuentran en suelos y sedimentos, están el rutilo y la anatasa, ambos de fórmula (TiO_2). Los óxidos mencionados no poseen carga permanente. En cambio, sus capacidades de intercambio de aniones o cationes dependen del

pH del sistema (16), debido a las cargas eléctricas dependientes del pH que resultan de la protonación-desprotonación de sus grupos superficiales.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Extracción de la fracción arcilla

La extracción de la fracción arcilla, al igual que del AH, se realizó a partir de un suelo agrícola de la Región Semiárida Pampeana Argentina clasificado como Haplustol Entico. La localización y propiedades físico químicas del mismo se describieron en el capítulo 2. Para la extracción de la fracción arcilla se utilizaron 50 g de muestra de suelo sobre la cual se eliminaron los carbonatos inorgánicos y la materia orgánica. Los carbonatos se eliminaron por adición de 50 mL de ácido acético al 5 %, mientras que la materia orgánica se removió por adición de peróxido de hidrógeno al 50 % y calentamiento suave, hasta que no se observó burbujeo en superficie debido a la eliminación de dióxido de carbono (17). A partir del suelo remanente, se preparó una suspensión y se obtuvo la fracción arcilla, constituida por partículas de tamaño $< 2 \mu\text{m}$, por sedimentación de la suspensión durante 24 hs y posterior recuperación de la fracción arcilla por decantación. La fracción arcilla se trató con NaCl 1 M, se agitó durante 1 h, se centrifugó, y se reemplazó el sobrenadante por nueva solución de NaCl 1 M. Este tratamiento se repitió tres veces para obtener una fracción arcilla intercambiada con cationes sodio. Luego la fuerza iónica de la suspensión se disminuyó progresivamente lavando tres veces con solución de NaCl 0,01 M (18). Finalmente la fracción arcilla se secó a 105 °C durante 24 h y se mortereó.

Se determinó la CIC de la fracción arcilla extraída del suelo y se realizó una caracterización mediante difracción de rayos X y espectroscopia IR. La composición elemental se determinó mediante fluorescencia de rayos X y se compararon los resultados obtenidos con la sonda EDAX acoplada a un microscopio electrónico de barrido. Además se determinó el tamaño y forma de las partículas en estado sólido a partir de microscopía electrónica de barrido (SEM) y el tamaño en suspensión mediante Dispersión de luz dinámica (Dynamic Light Scattering). Finalmente se observaron sus propiedades de

carga a partir de medidas de potencial zeta de suspensiones en diferentes electrolitos.

3.2.2. Capacidad de intercambio catiónico

Se determinó la CIC de la fracción arcilla empleando el método de extracción con acetato de amonio a pH 7 (11). El amonio adsorbido a los sitios de intercambio se desplazó con solución de NaCl al 10 %, y se cuantificó el amonio en el extracto por destilación y titulación con ácido bórico 2% (19).

3.2.3. Difracción de rayos X

El difractograma de la fracción arcilla extraída del suelo se realizó en el Departamento de geología de la UNS. La medición fue realizada sobre una muestra de la fracción seca utilizando un difractómetro de rayos X Rigaku Geigerflex entre 20° y 80° 2 θ utilizando la radiación CuK α .

3.2.4. Espectroscopia Infrarroja

Los espectros IR de la fracción arcilla se realizaron con un equipo Nicolet Nexus FT-IR. La muestra se preparó en pastilla de KBr (grado espectroscópico) al 1 %. Los espectros se registraron en el intervalo de números de onda 400-4000 cm⁻¹ y son el promedio de 32 barridos.

3.2.5. Composición elemental. Espectroscopia por fluorescencia de rayos X

Se utilizó un espectrómetro por fluorescencia de rayos X, MagiX con ánodo de Rodio, atmósfera de vacío, cristales de FLi 200, PX1, PX4, PE y detector de flujo. Una masa conocida de la fracción arcilla se mezcló con una sustancia ligante para formar una pastilla prensada apta para el análisis mediante espectrometría por fluorescencia de rayos X.

3.2.6. Tamaño de las partículas en estado sólido. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido (Scanning Electron Microscopy, SEM) fue utilizada para investigar el tamaño y forma de las partículas sólidas de la fracción arcilla. Tal como se mencionó para el AH en el capítulo 2, el estudio de la fracción arcilla se realizó con un microscopio JEOL 35 CF

equipado con un detector de electrones secundarios. La muestra se preparó en una matriz de grafito recubierta con una lámina de oro de aproximadamente 300 Å. Debido a que el equipo utilizado tiene acoplado también un analizador de rayos X dispersivo en energía (Energy Dispersive X-Ray, EDAX), el mismo fue utilizado para un análisis semicuantitativo de la composición elemental de la fracción arcilla.

3.2.7. Tamaño de las partículas en suspensión. Dispersión de luz dinámica

Las medidas de Dispersión de luz dinámica para determinar la distribución de tamaño de las partículas de la fracción arcilla se realizaron con un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern), que opera con un láser de $\lambda = 633$ nm y un ángulo de dispersión a 90° . Una suspensión stock de la fracción arcilla de 1 g L^{-1} se diluyó para obtener suspensiones de 0,025, 0,05 y $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Se adicionó un volumen medido de solución de NaCl 1 M o CaCl_2 0,05 M a cada suspensión para obtener una concentración final de 0,5 M y 0,01 M respectivamente. Se ajustó el pH de las suspensiones a un valor de 7 mediante la adición de soluciones de NaOH y HCl. Se colocó 1 mL de la suspensión preparada en la cubeta de medición y se registró la distribución de tamaño de partículas para las tres concentraciones de fracción arcilla luego de 5 min de adición del electrolito.

3.2.8. Medidas de potencial zeta (ζ)

El potencial zeta de la suspensión de fracción arcilla se midió en función del pH a fuerza iónica constante, con NaCl o CaCl_2 como electrolito, utilizando el mismo equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Para ello 50 mL de una suspensión de fracción arcilla $0,1 \text{ g L}^{-1}$, se colocó en un vaso de reacción con el electrolito ($FI=0,01$). El pH se ajustó a 10 con NaOH y se equilibró el sistema bajo agitación continua (450 rpm). Una vez equilibrado, se realizó la medida de potencial zeta, el pH se disminuyó adicionando un pequeño volumen de HCl, y el potencial zeta se midió nuevamente después de 10 min. Este procedimiento se repitió hasta llegar a un valor de pH 3.

3.3. Resultados y discusión

3.3.1. Capacidad de intercambio catiónico

La CIC sobre las superficies de arcillas es el criterio primario para su identificación (10). La CIC de la fracción arcilla extraída del suelo fue de 0,57 meq g⁻¹ ó 57 cmol_c Kg⁻¹. El valor obtenido se corresponde con la CIC de los minerales que predominan en las zonas semiáridas, esmectitas pobremente cristalinas e illitas con trazas de caolinitas (7) (15) (20).

3.3.2. Difracción de rayos X

La difracción de rayos X es una herramienta utilizada extensivamente para identificar minerales cristalinos en suelos. Además permite determinar las características de expansión-contracción de arcillas y la presencia de material ocluido (8) (9). El difractograma de la fracción arcilla se muestra en la Figura 3.6, comparado con los difractogramas de minerales puros: halloisita, illita, cuarzo y montmorillonita. Este análisis se ha hecho aquí solo a modo de control y no se pretendió hacer un estudio mineralógico completo, ya que hay estudios previos al respecto (7) (20). Dado que la fracción arcilla estudiada fue extraída de un suelo, es probable que en la misma coexistan arcillas de diferente mineralogía. De acuerdo a Hepper et al (20) e Iturri y Buschiazzo (7) la mineralogía de la fracción arcilla de los suelos de la Región Semiárida Pampeana es dominada por minerales amorfos, illitas y esmectitas pobremente cristalizadas, las cuales son mayormente illitas-esmectitas integradas. Dichos resultados se corresponden con los máximos de difracción observados en la muestra analizada.

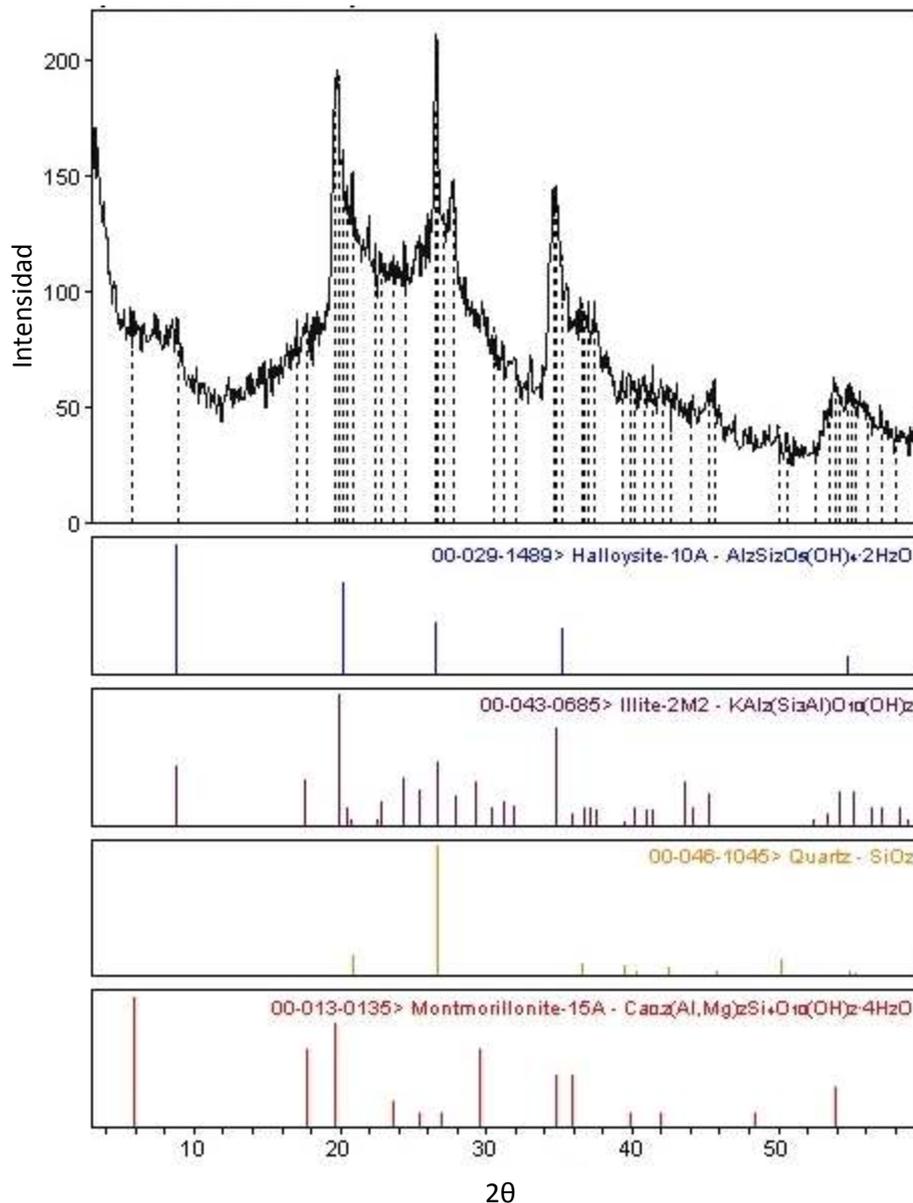


Figura 3.6. Difractograma de la fracción arcilla extraída de suelo. A modo comparativo se muestran los difractogramas de algunos minerales puros.

3.3.3. Espectroscopia Infrarroja

La espectroscopia IR provee información sobre la estructura, enlace y reactividad de los coloides del suelo. Ha sido utilizada para identificar constituyentes del suelo, y para elucidar características estructurales de componentes orgánicos e inorgánicos. Además, ha sido de importancia en el entendimiento de procesos químicos superficiales que involucran suelo y componentes del suelo (21). En la Figura 3.7 se muestra el espectro IR de la fracción arcilla y se indican las bandas típicas asignadas a componentes inorgánicos del suelo.

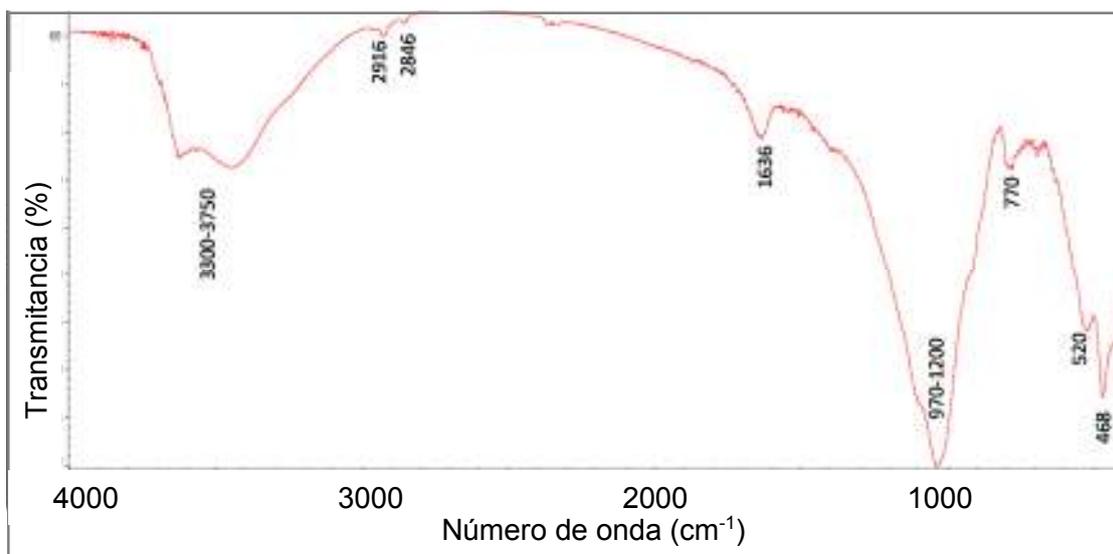


Figura 3.7. Espectro IR de la fracción arcilla estudiada.

La asignación de bandas IR observadas en la Figura 3.7 se presenta en la Tabla 3.1. El espectro IR presenta un conjunto de bandas características de compuestos inorgánicos, tales como minerales de arcilla y óxidos. Una banda de absorción amplia, en el rango de 3300-3750 cm^{-1} , se asocia a la tensión O-H de OH estructural y proveniente de agua sorbida a la superficie. Una banda intensa entre 970 y 1200 cm^{-1} es característica de tensión Si-O-Si cm^{-1} , y otras bandas más débiles se asocian a vibración de enlaces Si-O en silicatos, 770, 520 y 468 cm^{-1} . La banda a 1636 cm^{-1} seguramente corresponde a la flexión O-H-O de agua sorbida, y puede contener alguna señal correspondiente a impurezas de AH, ya que también se observan las bandas en el entorno 2916 y 2846, asociadas a tensión de enlaces C-H alifáticos (21) (22).

Tabla 3.1. Asignación de bandas IR de la fracción arcilla estudiada.

Vibración	Número de onda (cm⁻¹)
Tensión O-H de OH estructural	3300-3750
Tensión anti simétrica Si-O-Si en silicatos	970-1200
Tensión simétrica Si-O-Si	770
Otras vibraciones Si-O	520
Flexión O-H-O de agua sorbida	1636
Tensión de C-H alifático	2846 y 2916

3.3.4. Composición elemental. Espectroscopia por fluorescencia de rayos X

La espectroscopia por fluorescencia de rayos X es un método de análisis elemental, el cual evalúa la presencia y concentración de varios elementos en suelo, midiendo las características de la radiación secundaria emitida desde una muestra que ha sido excitada con una fuente de rayos X (14). La composición elemental de la fracción arcilla expresada como óxido (%) y elemento (%) se muestra en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2. Composición elemental de la fracción arcilla determinada por fluorescencia de rayos X.

Oxido	%	Elemento	%
SiO ₂	65,80	Si	30,80
Al ₂ O ₃	15,60	Al	8,30
Fe ₂ O ₃	7,00	Fe	4,90
K ₂ O	2,80	K	2,30
CaO	2,80	Ca	2,00
Na ₂ O	2,20	Na	1,60
MgO	1,90	Mg	1,14
TiO ₂	0,98	Ti	0,59
MnO	0,13	Mn	0,10
BaO	0,10	Ba	0,09
SrO	0,04	Sr	0,03
ZrO ₂	0,03	Zr	0,02
ZnO	0,02	Zn	0,02
Cr ₂ O ₃	0,02	Cr	0,01
Rb ₂ O	0,01	Rb	0,00
CuO	0,01	Cu	0,01
		Cl	0,34
		P	0,05
		S	0,03

La Tabla 3.3 indica la composición elemental de óxidos de la fracción arcilla analizada comparada con la composición elemental de los minerales de arcilla predominantes (3) (7) (15). Dado que la fracción arcilla es una mezcla de minerales, la composición de óxidos obtenida mediante fluorescencia de rayos X se relaciona bastante bien con las arcillas predominantes.

Tabla 3.3. Comparación de la composición elemental de óxidos en la fracción arcilla y en los minerales de arcilla predominantes.

Óxido (%)	Mineral			
	Fracción arcilla	kaolinita	illita	montmorillonita
SiO ₂	65,8	46,5	53,7	59,4
Al ₂ O ₃	15,6	39,5	27,0	19,3
Fe ₂ O ₃	7,0		3,2	7,9
MgO	1,9		2,3	6,4
K ₂ O	2,8		8,0	
CaO	2,8			2,7

3.3.5. Tamaño de las partículas en estado sólido. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La Figura 3.8.a muestra la micrografía SEM de la muestra de fracción arcilla. Se observa que la misma está formada por partículas o agregados de partículas de tamaño variable. La Figura 3.8.b muestra el espectro EDAX correspondiente a las partículas de fracción arcilla mostradas en la Figura 3.8.a. Se observa claramente la aparición de bandas asignadas a elementos inorgánicos característicos de la fracción mineral en suelos, tales como silicio, aluminio, magnesio, sodio, potasio, hierro y oxígeno.

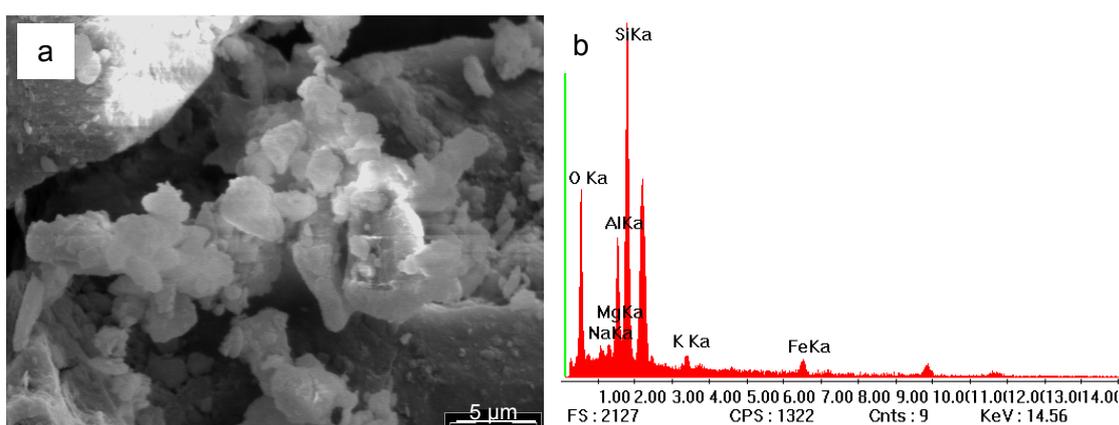


Figura 3.8. a) Micrografía SEM de la muestra de fracción arcilla. b) Espectro EDAX correspondiente a las partículas de fracción arcilla de la Figura 3.8a.

Con propósitos comparativos, los resultados de composición elemental de elementos mayoritarios obtenidos con la sonda EDAX se muestran junto a

los de fluorescencia de rayos X en la tabla 3.4. Se observa que la proporción de elementos se corresponde adecuadamente entre las dos técnicas, a excepción de los elementos hierro y sodio, para los cuales la sonda EDAX arrojó una proporción igual al doble de la determinada empleando fluorescencia. Esto último refuerza el concepto de que el análisis por EDAX no permite realizar un estudio cuantitativo, sino que debería emplearse para identificar de modo semicuantitativo los elementos presentes en la superficie de una porción de muestra (23). Las variaciones entre las dos técnicas también podrían deberse a la heterogeneidad química de la fracción arcilla, algo que es muy esperable en suelos. El análisis por EDAX corresponde a una porción microscópica de la muestra y los resultados pueden ser variables debido a heterogeneidad. La fluorescencia de rayos X, por otra parte, analiza una cantidad de muestra mucho más grande, y los resultados representan valores más cercanos a los valores promedios.

Tabla 3.4. Composición elemental de la fracción arcilla determinada por fluorescencia y EDAX.

Elemento	Composición elemental (%)	
	Fluorescencia	EDAX (4000X)
Si	30,8	33,0
Al	8,3	10,2
Fe	4,9	8,8
K	2,3	2,8
Na	0,8	1,9
Mg	1,1	1,3

3.3.6. Tamaño de las partículas en suspensión. Dispersión de luz dinámica

La metodología de Dispersión de luz dinámica (Dynamic light scattering) mide el movimiento Browniano de las partículas y lo relaciona al tamaño de las mismas. Para ello ilumina las partículas con un láser y analiza las fluctuaciones de intensidad en la luz dispersada. Si el sistema está totalmente desagregado, la medición arroja datos sobre el tamaño individual de las partículas. Si el sistema está agregado, se detectan principalmente tamaños que corresponden a los agregados de partículas.

En la Figura 3.9 se muestran las distribuciones de tamaño de partículas para muestras conteniendo diferentes concentraciones de sólido preparadas en NaCl 0,5 M. Se observa que el diámetro medio de partícula en NaCl 0,5 M oscila entre 700 nm para la suspensión 0,025 g L⁻¹ y 900 nm para las suspensiones de concentración de arcilla de 0,05 y 0,10 g L⁻¹. Este pequeño incremento sugiere que hay un pequeño aumento en la agregación de las partículas cuando se aumenta la concentración de sólido. Además, los resultados muestran que todas las partículas o agregados tienen tamaño < 2 μm, lo que corrobora la eficiencia del método de obtención de la fracción arcilla por sedimentación durante 24 hs.

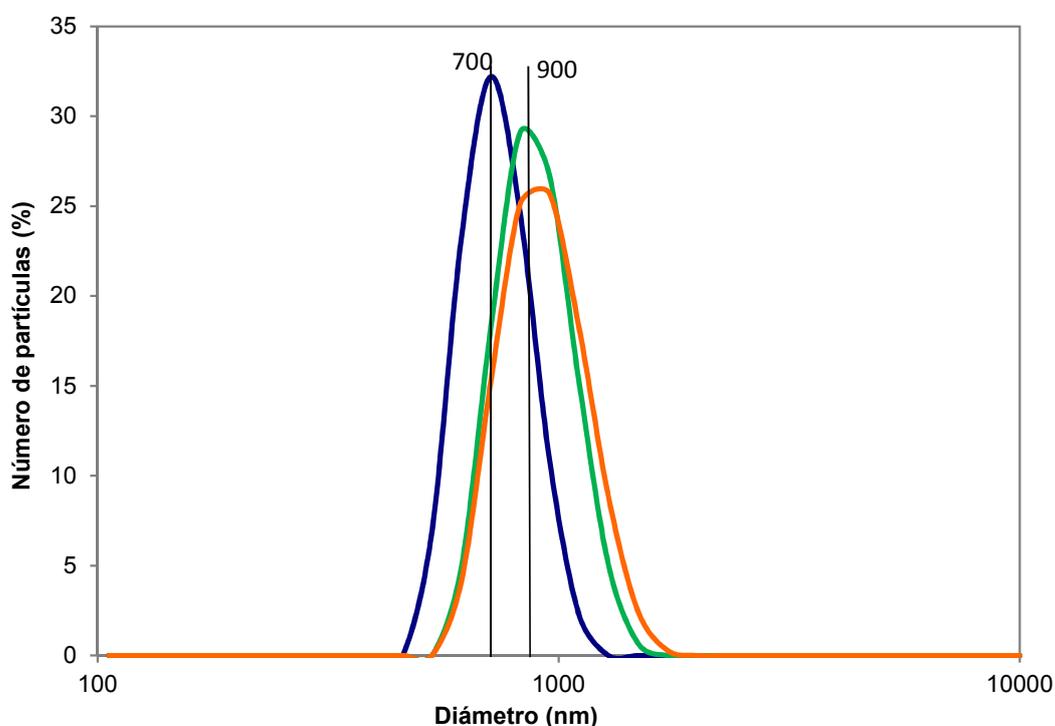


Figura 3.9. Distribución de tamaño de partículas determinada por Dispersión de luz dinámica en NaCl 0,5 M para 3 concentraciones de suspensión arcilla: 0,025 (-), 0,05 (-) y 0,10 (-) g L⁻¹.

3.3.7. Medidas de potencial zeta

La Figura 3.10 muestra el efecto del pH sobre el potencial zeta de la fracción arcilla en presencia de NaCl y CaCl₂. El potencial zeta es negativo en los dos casos. En presencia de NaCl es de alrededor de -20 mV a pH 3 y se vuelve monótonamente más negativo hasta un valor de -30 mV a pH 10. Este

comportamiento es predecible para la fracción inorgánica de suelo donde silicoaluminatos y filosilicatos dominan la composición (24) (25), y resulta de la presencia de cargas estructurales negativas sobre los minerales de arcilla y de la disociación de grupos superficiales Al-OH y Si-OH (26). En CaCl₂ el potencial zeta de la fracción arcilla es siempre menos negativo que en NaCl. Es de alrededor de -7 mV a pH 3 y pasa a ser de alrededor de -12 mV a pH alto. La adsorción de los cationes divalentes a la superficie del mineral, causa seguramente la disminución en el potencial zeta negativo cuando el calcio está presente (27).

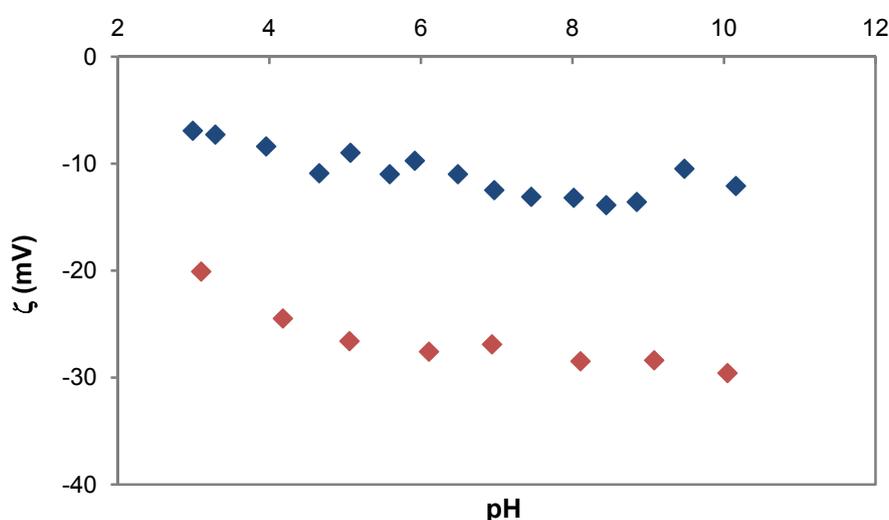


Figura 3.10. Potencial zeta de la fracción arcilla en presencia de NaCl (series de color rojo) y CaCl₂ (series de color azul). (FI=0,01)

3.4. Conclusiones

La determinación de la composición elemental de la fracción arcilla mediante fluorescencia y sonda EDAX, sumada a los datos aportados por difracción de rayos X, espectroscopia IR y la CIC de esta fracción, están de acuerdo con la presencia de una mezcla de minerales de arcilla de tipo esmectitas pobremente cristalinas e illitas con trazas de caolinitas, tal como se menciona en varios trabajos publicados en suelos de la Región Semiárida Pampeana. Además, se pudo determinar el tamaño de las partículas de la fracción, tanto en estado sólido como en suspensión, y sus propiedades de carga, lo cual ayudará a predecir su comportamiento de agregación en

sistemas compuestos. La información obtenida es la base para la interpretación de los resultados en los capítulos 5 y 6 de esta tesis.

3.5. Bibliografía

1. Hillel D. 2004. Introduction to environmental soil physics. Elsevier Academic press. Massachusetts, USA. pp 485.
2. Gee GG & Or D. 2002. Particle-Size analysis. En: Methods of soil analysis. Part 4-Physical Methods. Ed. Dane HJ & Topp GC. SSSA. Madison. pp 255-289.
3. Karathanasis AD. 2012. Structural allocation of clay mineral elemental components. En: Methods of soil analysis. Part 5-Mineralogical methods. Ed. Ulery AL & Drees LR. SSSA. Madison. pp 465-483.
4. Giuffré L. 2005. Minerales. En: Principios de edafología con énfasis en suelos argentinos Ed. Conti ME. Ed. Facultad de Agronomía. Buenos Aires. pp 27-42.
5. Buschiazzo DE, Aymar SB, Stahr K. 1995. Factores que afectan la estabilidad estructural de suelos de la Región Semiárida Pampeana Central (Argentina). Ciencia del Suelo. 13:66-69.
6. Porta Casanellas J, Lopez-Acevedo Reguerín M, Roquero De Laburu C. 1999. Edafología para la agricultura y el medio ambiente. Ediciones Mundi-Prensa. Barcelona. pp 848.
7. Iturri LA & Buschiazzo DE. 2014. Cation exchange capacity and mineralogy of loess soils with different amounts of volcanic ashes. Catena. 121:81-87.
8. Conklin AR. 2005. Introduction to soil chemistry, analysis and instrumentation. Chapter 8, Spectroscopy. John Wiley & Sons. New Jersey. pp 147-173.
9. Molina FV. 2014. Soil Colloids properties and ion binding. pp 545.
10. Laird D & Fleming P. 2012. Analysis of layer charge, cation and anion exchange capacities, and synthesis of reduced charge clays. En: Methods of Soil Analysis. Part 5-Mineralogical methods. Ed. Ulery AL & Drees LR. SSSA. Madison. pp 485-508.
11. Sumner ME & Miller WP. 1996. Cation exchange capacity and exchange coefficients. En: Methods of soil analysis. Part 3-Chemical Methods. Ed. Sparks DL. SSSA. Madison, Wisconsin, USA. pp 1201-1230.
12. Pecini EM & Avena MJ. 2013. Measuring the Isoelectric Point of the Edges of Clay Mineral Particles: The Case of Montmorillonite. Langmuir. 48(29):14926–14934.
13. Avena MJ & De Pauli CP. 1998. Proton Adsorption and Electrokinetics of an Argentinean Montmorillonite. Journal of colloid and interface science. 202:195-204.
14. Karathanasis AD & Hajek BF. 1996. Elemental analysis by X-ray fluorescence spectroscopy. En: Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods. Ed. Sparks DL. SSSA. Madison, Wisconsin. pp 161-223.
15. Acebal SG, Aguirre ME, Santamaría RM, Mijovilovich A, Petrick S, Saragovi C. 2003. Chapter 49 - Distribution and characterization of forms of Fe and Al in particle-size fractions of an Entic Haplustoll by selective dissolution techniques, X-ray powder diffraction and Mössbauer

spectroscopy. En: *A Clay Odyssey*. Ed. Dominguez E, Mas G, Cravero F. Elsevier Science Amsterdam. pp 465-472.

16. Bohn HL, McNeal BL, O'Connor GA. 1993. *Química del suelo*. Limusa. 370 pp.

17. Kroetsch D & Wang D. 2007. Particle size distribution. En: *Soil sampling and methods of analysis*. Ed. Carter MR & Gregorich EG. CRC Press. United States. pp 713-725.

18. Tombácz E. 2003. Effects of environmental relevant organic complexants on the surface charge and the interaction of clay mineral and metal oxide particles. En: *Role of interfaces in environmental protection*. Ed. Barany S. Kluwer Academic Publishers. pp. 397-494.

19. Bremner JM. 1996. Nitrogen Total. En: *Methods of Soil Analysis. Part 3. Chemical Methods*. Ed. Sparks DL. SSSA. Madison WI. pp 1149-1176.

20. Hepper EN, Buschiazzo DE, Hevia GG, Urioste A, Antón L. 2006. Clay mineralogy, cation exchange capacity and specific surface area of loess soils with different volcanic ash contents. *Geoderma*. 135:216-223.

21. Johnston CT & Aochi YO. 1996. Fourier transform infrared and Raman spectroscopy. En: *Methods of soil analysis Part 3 - Chemical methods*. Ed. Sparks DL. SSSA. Madison, Wisconsin USA. pp 269-321.

22. White JL & Roth CB. 1986. Infrared Spectrometry. En: *Methods of soil analysis. Part 1. Physical and Mineralogical methods*. Ed. Klute A. SSSA. Madison, Wisconsin USA. pp 291-330.

23. Norman White G. 2008. Scanning Electron Microscopy. En: *Methods of soil analysis. Part 5. Mineralogical methods*. Ed. Ulery AL & Drees LR. SSSA. Madison, Wisconsin USA. pp 269-297.

24. Jiang CL, Séquaris JM, Vereecken H, Klumpp E. 2012. Effects of inorganic and organic anions on the stability of illite and quartz soil colloids in Na-, Ca- and mixed Na–Ca systems. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 415:134-141.

25. Martínez RE, Sharma P, Kappler A. 2010. Surface binding site analysis of Ca²⁺-homoionized clay–humic acid complexes. *Journal of Colloid and Interface Science*. 352:526-534.

26. Tombacz E & Szekeres M. 2006. Surface charge heterogeneity of kaolinite in aqueous suspension. *Applied Clay Science*. 34:105-124.

27. Heil D & Sposito G. 1993. Organic matter role in illitic soil colloids flocculation: II. surface charge. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57:1246-1253.

Capítulo 4. Cinética de Agregación del Ácido Húmico: Efecto del pH y de Iones Calcio

4.1. Introducción

Las SH, tales como AH y AF, juegan un rol importante en el medioambiente. Son moléculas con gran capacidad para enlazarse a iones metálicos, a moléculas orgánicas y a la superficie de sólidos y minerales, por lo que afectan de forma significativa la estructura del suelo, la movilidad ambiental de contaminantes orgánicos y la biodisponibilidad de iones metálicos.

Tal como se indicó en el Capítulo 2, hay dos corrientes de opinión diferentes respecto de la estructura de las SH. El punto de vista tradicional sugiere que las SH están formadas por moléculas poliméricas relativamente grandes, con pesos moleculares elevados que varían desde 2000 Da para las fracciones más pequeñas a 1.300.000 Da para las moléculas más grandes (1). La corriente más moderna, por el contrario, considera que las SH son ensamblados supramoleculares de moléculas de tamaño relativamente pequeño (2) (3), las cuales forman asociaciones dinámicas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas y puentes de hidrógeno (4). Tal como indicaron Avena y Wilkinson (5), aunque estos dos modelos conceptuales están aún en discusión, tanto los defensores del modelo polimérico como los del modelo supramolecular concuerdan en que las SH son capaces de formar agregados en medio acuoso o en estado sólido. Estos agregados son estabilizados por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, y por la presencia de iones metálicos de elementos tales como calcio, hierro y aluminio (6) (7) (8). Es por ello que la caracterización de SH se focaliza frecuentemente en las interacciones intermoleculares (9) (10) (11), en los factores que promueven la agregación o desagregación (12) (13) (14) y en los mecanismos de los procesos de agregación-desagregación (15) (16).

La agregación de AH, como ocurre con todas las SH, es el resultado de interacciones moleculares que dependen de las condiciones medioambientales, tales como pH, fuerza iónica, presencia de iones metálicos multivalentes, compuestos orgánicos y partículas sólidas (9) (17). La agregación en ausencia de cationes es usualmente favorecida por la disminución del pH de la solución debido a la protonación de grupos funcionales, principalmente carboxilatos y fenolatos. Esto conduce a una disminución de la repulsión electrostática entre las moléculas y a la formación de puentes de hidrógeno intermoleculares y

otras interacciones no electrostáticas (18). En presencia de cationes multivalentes la agregación es promovida por neutralización de cargas y formación de puentes catiónicos entre diferentes moléculas de AH (19). Simulaciones recientes de dinámica molecular sugieren que el calcio está principalmente asociado a grupos carboxílicos de las moléculas de materia orgánica natural, formando complejos bidentados (20). Esto muestra que el calcio puede afectar directamente la agregación formando puentes entre grupos carboxílicos de diferentes moléculas, enlazándolas y manteniéndolas unidas. Además los iones calcio pueden afectar la agregación coordinando simultáneamente dos grupos carboxílicos de la misma molécula, lo cual produce un complejo calcio-AH con menor carga neta negativa, permitiendo que dos o más complejos se aproximen entre sí e interactúen vía puente de hidrógeno (20).

El efecto de los cationes en la agregación de AH es usualmente dependiente del pH. En el caso del calcio, por ejemplo, Balouousha et al. (6) mostraron que a pH 4,5, donde los grupos funcionales están débilmente disociados y la carga negativa de los AH es baja, hay un pequeño efecto de la concentración de iones calcio en la agregación de AH. En contraste, a pH 9,4, donde la mayoría de los grupos funcionales están disociados y la carga negativa es alta, hay un efecto importante de la concentración de calcio sobre la agregación, debido al enlace a través de iones calcio.

La mayor parte de los estudios referidos a las propiedades reactivas de las SH se han realizado en condiciones de equilibrio. Últimamente, sin embargo, son cada vez más frecuentes los estudios cinéticos, ya que hay una concientización en aumento respecto a que la cinética de reacción de las SH con otras sustancias es importante para determinar su reactividad en la naturaleza. Town et al. (21), por ejemplo, hallaron que el tamaño de las unidades de AH puede afectar significativamente su cinética de enlace a metales, mientras que Yamashita et al. (22) investigaron recientemente la cinética de deposición de AH en medio poroso, evaluando la reactividad de los AH con la superficie de minerales. Igualmente importante a la cinética de reacción con otras sustancias, es la dinámica de la agregación, donde moléculas de SH reaccionan entre ellas. La agregación de SH es muy probablemente un proceso medioambiental de relevancia y su estudio ayudará

a comprender el mecanismo de agregación y los procesos que controlan el transporte de contaminantes orgánicos e inorgánicos en la naturaleza.

En el caso de los AH, aunque se han publicado varios estudios de agregación, todos ellos se refieren principalmente a la agregación bajo condiciones de equilibrio o cuasi equilibrio. Ningún estudio hasta ahora ha sido focalizado sobre la cinética de agregación de AH. Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es estudiar la cinética de agregación de una muestra de AH bajo diferentes condiciones. Los efectos del pH y la concentración de calcio son investigados a fin de desarrollar un mecanismo de agregación simple y obtener información respecto de la dinámica de los AH en el medioambiente.

4.2. Materiales y Métodos

El AH estudiado es la muestra extraída de suelo ya descrita en el capítulo 2.

4.2.1. Medidas de potencial zeta (ζ)

Para obtener información de la interacción electrostática entre las moléculas de AH, se midió su potencial zeta bajo diferentes condiciones experimentales, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Se realizaron tres tipos de experimentos: (a) medidas de potencial zeta vs. pH a fuerza iónica constante, con NaCl o CaCl₂ como electrolito soporte; (b) medidas de potencial zeta vs. concentración de CaCl₂ a pH constante; y (c) medidas de potencial zeta vs. tiempo, a diferentes pH y concentraciones de CaCl₂. Las medidas de potencial zeta vs. pH, ya fueron descritas y los resultados mostrados en el capítulo 2. Para las medidas de potencial zeta vs. concentración de CaCl₂, alícuotas de 10 mL de una solución de 50 mg L⁻¹ de AH en NaCl 0,01 M se colocaron en tubos con tapa y se reguló el pH al valor deseado. Se adicionaron a los tubos diferentes volúmenes de una solución de CaCl₂ 0,6 M a fin de cubrir un rango de concentraciones de calcio desde 0 a 3 mM. Luego de 12 h, el pH se midió nuevamente para asegurar que su valor fuese igual en todos los tubos antes de la medición. Para las medidas de potencial zeta vs. tiempo, una solución de 50 mg L⁻¹ de AH en NaCl 0,01 M se preparó al valor de pH deseado. Un dado volumen de solución de CaCl₂ 0,6 M

se adicionó al sistema para lograr la concentración de calcio deseada y el potencial zeta se midió a diferentes tiempos durante 1 h.

4.2.2. Experimentos de cinética de agregación

Los experimentos de cinética de agregación se realizaron en un sistema en batch utilizando una celda de reacción a temperatura controlada ($25 \pm 0,2$ °C) cubierto con una tapa de vidrio. Antes de comenzar el experimento, se preparó una solución stock de AH de 1000 mg L^{-1} disolviendo el AH sólido a pH 10, lo cual permite obtener una muestra bien disuelta (6) y bien desagregada (5). Una solución de 50 mg L^{-1} de AH se preparó en el vaso de reacción adicionando un volumen medido de la solución stock de AH a 50 mL de NaCl 0,01 M, el cual se usó como electrolito soporte, y el pH se ajustó al valor deseado por adición de pequeñas alícuotas de NaOH o HCl.

El experimento cinético para evaluar agregación comenzó con la adición de un volumen adecuado de una solución de CaCl_2 0,6 M al vaso de reacción a fin de obtener concentraciones de calcio de 0,3; 0,8; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8; 2,4 y 3,2 mM. Estas concentraciones están dentro del rango de concentraciones encontradas en soluciones de suelo en todo el mundo (23). Se mantuvo una agitación constante (450 rpm) utilizando un agitador magnético IKA RH KT/C. A diferentes tiempos de reacción (cada 1 o 2 min durante los primeros 15 min de reacción y cada 10 min durante el tiempo restante), se extrajo una alícuota de la solución, se filtró con una membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro para separar los agregados del sobrenadante, y se cuantificó el AH en solución registrando el espectro con un espectrofotómetro UV visible de arreglo de diodos Agilent 8453 equipado con celda de cuarzo Hellma de 1 cm, en un rango de longitud de onda de 200 a 900 nm. Se construyeron curvas de calibración a los valores de pH de trabajo, con soluciones de AH preparadas en un rango de 2 a 60 mg L^{-1} a partir de la solución stock.

La cinética de agregación se evaluó graficando el grado de progreso de la reacción de agregación (α), en función del tiempo (t). α se definió como:

$$\alpha = \frac{C_0 - C}{C_0}$$

Ecuación 4.1.

Donde C_0 es la concentración inicial de AH (es decir la concentración de AH en el experimento) y C es la concentración de AH que permanece en solución a un cierto tiempo de reacción. Un valor de $\alpha = 0$ significa que la agregación es de 0%, mientras que un valor de $\alpha = 1$ significa que hay 100% de agregación. A las curvas α vs. t se las llamará de aquí en adelante curvas cinéticas de agregación.

4.2.3. Microscopía óptica

La microscopía óptica fue utilizada para observar los agregados formados en los experimentos. Para ello, una solución de AH de 50 mg L^{-1} , con calcio 4 mM a pH 7, se observó con un microscopio óptico HOKENN equipado con un software para análisis de micro imágenes.

4.3. Resultados y Discusión

La Figura 4.1 muestra el potencial zeta de la muestra de AH bajo diferentes condiciones experimentales. El efecto del pH en soluciones de NaCl y CaCl_2 se observa en la Figura 4.1a, y dicho comportamiento fue descrito en el Capítulo 2. A modo recordatorio se menciona que el potencial zeta es negativo a cualquier valor de pH en ambos electrolitos y en CaCl_2 , el potencial zeta es siempre menos negativo que en NaCl. Estas diferencias resultan de la unión de iones calcio a las moléculas de AH.

El efecto de la concentración de calcio a pH 5, 7 y 9 se observa en la Figura 4.1b. El comportamiento es independiente del pH, y en todos los casos el potencial zeta es de alrededor de -37 mV en ausencia de calcio, y se vuelve menos negativo con el incremento de la concentración del catión. El efecto del calcio es significativo hasta una concentración de calcio 1 mM , donde el potencial zeta es de -19 mV . Por encima de esta concentración los cambios son más pequeños y el potencial zeta alcanza un valor de -15 mV a 3 mM de calcio. Aunque la unión de iones calcio disminuye la carga neta negativa de las moléculas, haciendo el valor de potencial zeta menos negativo, es claro que esta unión no es capaz de revertir la carga a ningún valor de pH. Los resultados obtenidos son similares a los observados por Majzik y Tombácz (24) para el potencial zeta de un AH a pH 6,5 y concentraciones de calcio variables.

Los resultados también concuerdan con las medidas potenciométricas de unión de calcio a SH combinado con cálculos realizados con el modelo NICA-Donnan, que indican que la unión de iones calcio a los grupos funcionales de las moléculas sumado la unión no específica debida a atracción electrostática del cation por las moléculas de AH, no produce reversión de carga (25) (26) (27).

La Figura 4.1c. muestra la evolución del potencial zeta en función del tiempo luego de la adición de calcio. El potencial zeta ya está estabilizado en un valor de equilibrio luego de 2 min de reacción, el cual es el tiempo más corto que puede ser explorado en este tipo de experimentos. El valor constante de potencial zeta indica que la unión de iones calcio al AH se produce en menos de 2 min, por lo cual será considerado un proceso rápido en comparación con el proceso de agregación que ocurre más lentamente (ver abajo). Este comportamiento está en acuerdo con los resultados de Town et al. (21), quienes demostraron que para el caso de iones metálicos que se deshidratan rápidamente como el $\text{Cu}(\text{OH}_2)_6^{2+}$, cuyo caso es similar a los iones calcio en solución acuosa, el enlace es muy rápido.

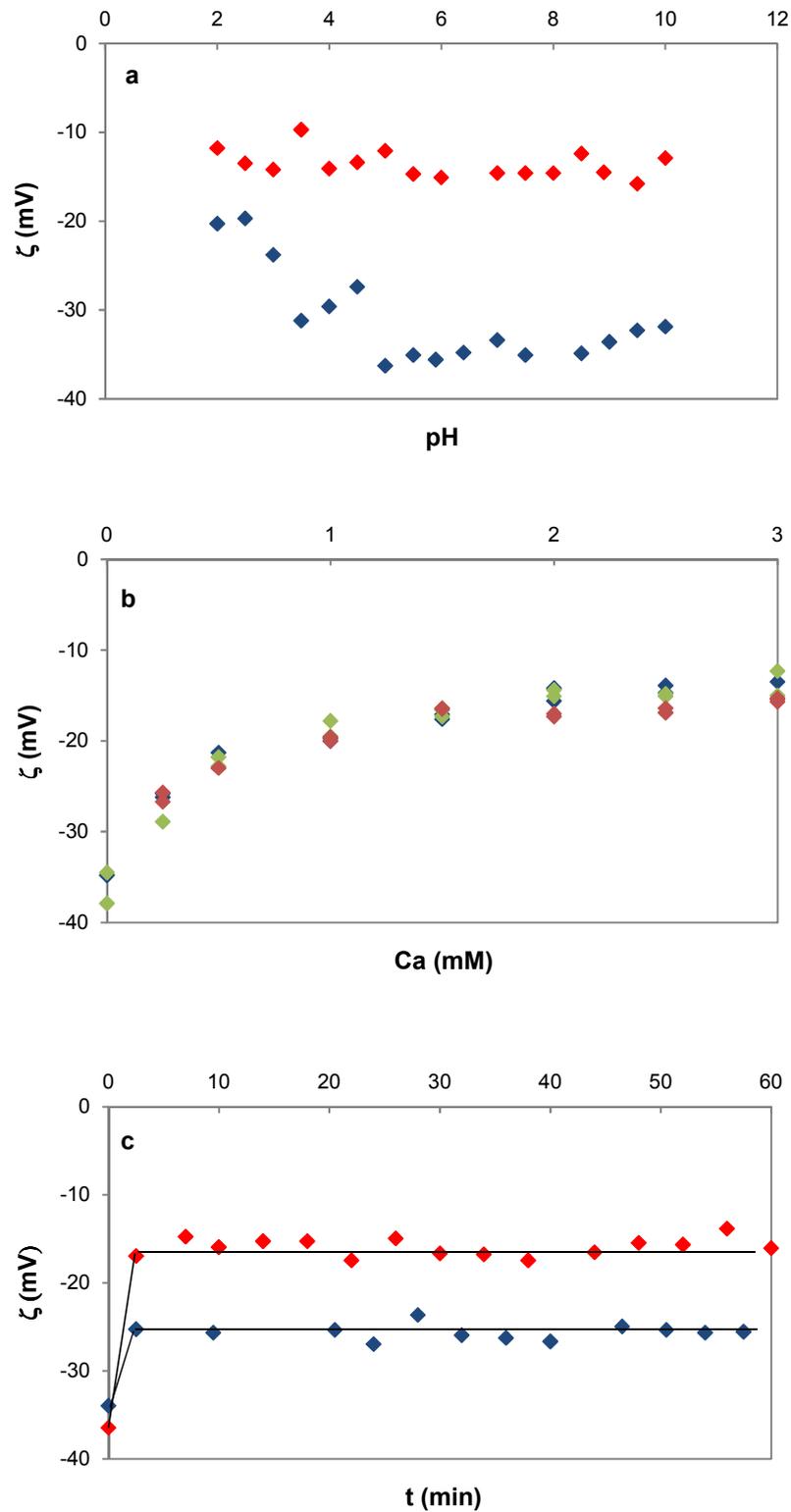


Figura 4.1. (a) Potencial zeta del AH en NaCl (◆) y en CaCl₂ (◆) (FI=0,01); (b) influencia de la concentración de calcio sobre el potencial zeta a pHs 5 (◆), 7 (◆) y 9 (◆); (c) efecto del tiempo sobre el potencial zeta luego de variar la concentración de calcio desde 0 a 0,8 mM (◆) o a 2 mM (◆). Los datos a t=0 corresponden al valor de potencial zeta en NaCl 10 mM, antes de la adición de calcio. Las líneas se dibujaron como una guía visual.

La Figura 4.2a. muestra los cambios en el espectro UV visible de la solución sobrenadante durante un experimento cinético de agregación, donde cada espectro se corresponde con un tiempo de muestreo diferente. La Figura 4.2b. muestra la curva cinética de agregación resultante de esos espectros. La absorbancia a cualquier longitud de onda disminuye con el tiempo, indicando una disminución en la concentración de AH disuelto y por lo tanto un incremento en la agregación. La curva cinética de agregación muestra que la agregación tiene lugar principalmente en los primeros 15-20 min de reacción y alcanza un valor constante para tiempos más largos. No todas las moléculas de AH forman agregados durante el tiempo de reacción de 60 min, dado que $\alpha < 1$ a ese tiempo.

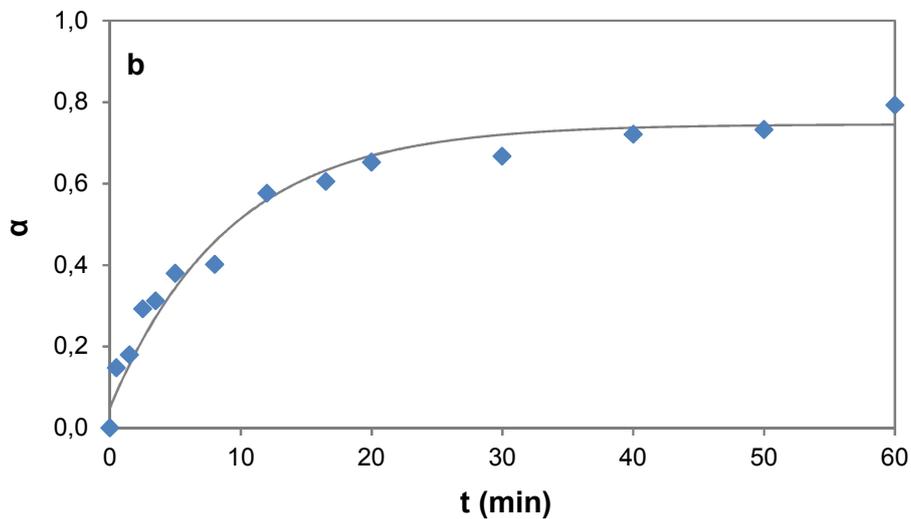
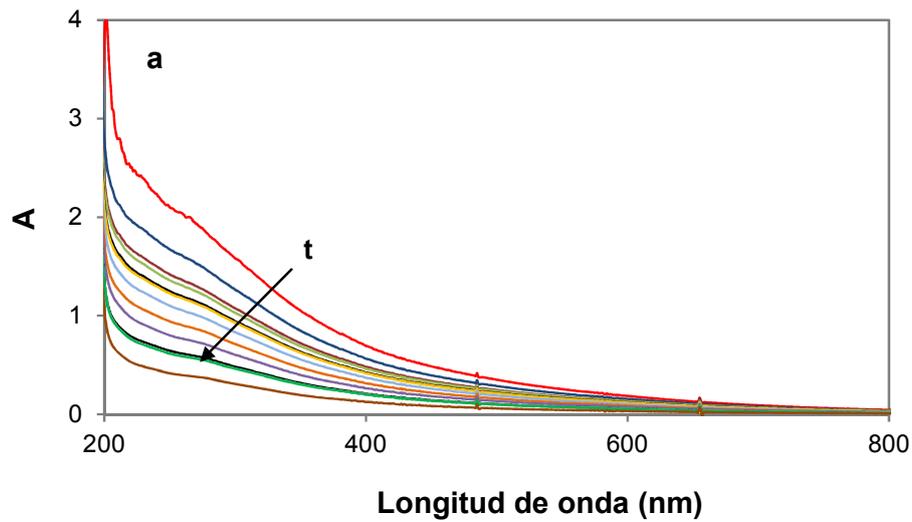


Figura 4.2. (a) Espectro UV visible del sobrenadante de una solución de AH durante un experimento cinético a pH 5 y 1,6 mM de calcio. Cada espectro se corresponde con un tiempo de muestreo diferente. La flecha con el símbolo t indica aumento en el tiempo de muestreo desde 0 a 60 min; (b) Curvas cinéticas de agregación resultantes de los espectros mencionados arriba. La línea es el mejor ajuste calculado a partir de la Ecuación 4.4 y los parámetros de ajuste de la Tabla 4.1.

Las curvas cinéticas de agregación obtenidas a pH 5 a diferentes concentraciones de calcio se muestran en la Figura 4.3. Se observa un importante efecto de la concentración de calcio. La agregación es insignificante con 0,8 mM de calcio, pero con concentraciones más altas del cation la agregación se produce rápidamente y aumenta con el incremento de la concentración de calcio. Datos cinéticos similares a los indicados en la Figura

4.3 se analizaron en términos de la siguiente ecuación de velocidad de primer orden (28):

$$V = -\frac{dC}{dt} = k(C - C_f) \quad \text{Ecuación 4.2.}$$

Donde V es la velocidad de agregación, k es la constante de velocidad y C_f es la concentración final de AH disuelto a tiempos largos de reacción, tal como la concentración de AH que permanece disuelto luego de llegar a la meseta en la curva cinética de agregación. Integrando la Ecuación 4.2 se obtiene:

$$C = C_f + (C_o - C_f) e^{-kt} \quad \text{Ecuación 4.3.}$$

O en términos de α :

$$\alpha = \alpha_f - \alpha_f e^{-kt} \quad \text{Ecuación 4.4.}$$

Donde $\alpha_f = (C_o - C_f)/C_o$, es el valor de α a tiempos largos de reacción (luego de alcanzar la meseta de la curva). La constante de velocidad k puede ser calculada fácilmente por ajuste de las curvas con la ecuación 4.4, y por lo tanto la velocidad inicial de agregación, V_o , puede ser calculada a partir de la ecuación:

$$V_o = k (C_o - C_f) = k C_o \alpha_f \quad \text{Ecuación 4.5.}$$

La cual se obtiene directamente de la Ecuación 4.2 bajo la condición $C = C_o$ a $t = 0$. El uso de estas ecuaciones no tiene el propósito de obtener un mecanismo de agregación. Sin embargo, este procedimiento permite calcular la velocidad de agregación inicial con parámetros obtenidos por ajuste de todos los puntos de una curva cinética de agregación, evitando los problemas de estimar una velocidad a partir de la pendiente inicial de una curva utilizando solo los primeros puntos experimentales.

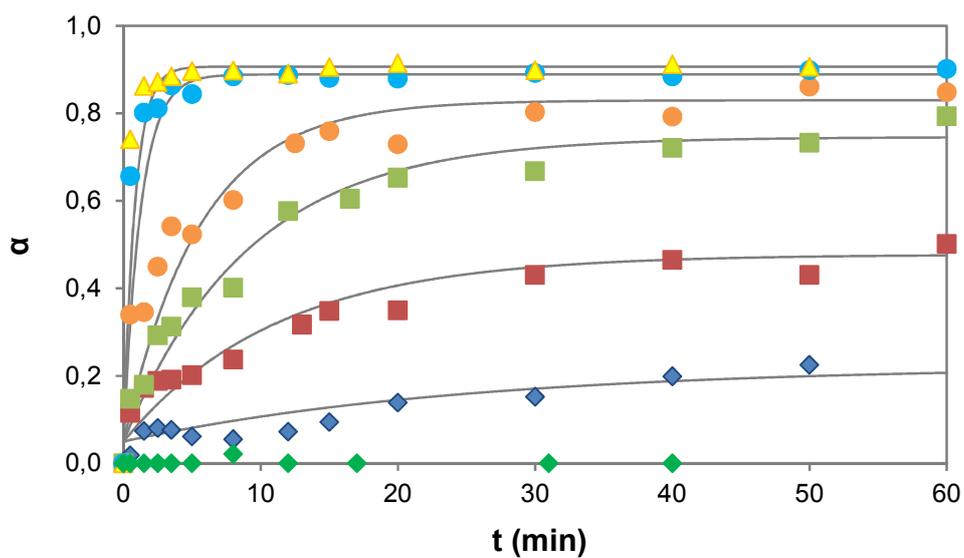


Figura 4.3. Curvas cinéticas de agregación del AH a pH 5 y a diferentes concentraciones de calcio: 0,8 (◆), 1,2 (◆), 1,4 (■), 1,6 (■), 1,8 (●), 2,4 (●) y 3,2 (▲) mM. Las líneas representan el mejor ajuste calculado por la Ecuación 4.4 y los parámetros de la Tabla 4.1.

Los cálculos realizados a partir de la Ecuación 4.4 se muestran como líneas en las Figuras 4.2 y 4.3, y los parámetros correspondientes, k , α_f y V_0 , se muestran en la Tabla 4.1.

Tabla 4.1. Parámetros cinéticos.

Calcio (mM)	pH 5			pH 7			pH 9		
	α_f	k^a	V_0	α_f	k	V_0	α_f	k	V_0
0,3	--- ^b	---	---	0	0	0	---	---	---
0,8	0	0	0	0,01	0,05	0,03	0,06	0,03	0,10
1,0	---	---	---	---	---	---	0,17	0,05	0,40
1,2	0,16	0,04	0,30	0,20	0,09	0,90	0,58	0,12	3,40
1,3	---	---	---	0,50	0,09	2,20	0,66	0,20	5,90
1,4	0,43	0,09	1,90	0,63	0,09	2,60	---	---	---
1,6	0,70	0,11	3,30	0,68	0,13	3,80	0,74	0,28	9,60
1,8	0,78	0,18	7,00	0,74	0,35	11,20	0,85	0,90	35,70
2,4	0,84	0,80	31,20	0,84	0,80	28,90	0,89	1,60	66,30
3,2	0,86	1,20	46,60	0,87	1,10	45,50	0,92	2,10	94,00

^a unidades de k : min^{-1} ; unidades de V_0 : $\text{mg L}^{-1} \text{min}^{-1}$

^b (---) no medido.

Los efectos de la concentración de calcio sobre la velocidad inicial de agregación se grafican en la Figura 4.4 para los tres valores de pH estudiados. La concentración mínima necesaria para producir agregación está entre 0,8 y 1,2 mM (tal como se observa en la Tabla 4.1). Por lo tanto, un valor de $1,0 \pm 0,2$ mM puede reconocerse como un valor de concentración de agregación crítica o concentración de coagulación crítica (CCC) para el AH estudiado. Wall y Chopin (29) hallaron una concentración crítica similar para la coagulación de un AH Aldrich, con cationes calcio a pH 8,3, aunque no a partir de estudios cinéticos. Mientras que Hong y Elimelech (30) encontraron que la materia orgánica natural coaguló a alrededor de 1 mM de calcio a pH entre 4 y 8. La Figura 4.4 también muestra que por encima de la CCC la velocidad de agregación aumenta con el incremento de la concentración del catión. El efecto de la concentración de calcio sobre la velocidad de agregación es bastante similar a pH 5 y 7, mientras que es más notable el efecto a pH 9.

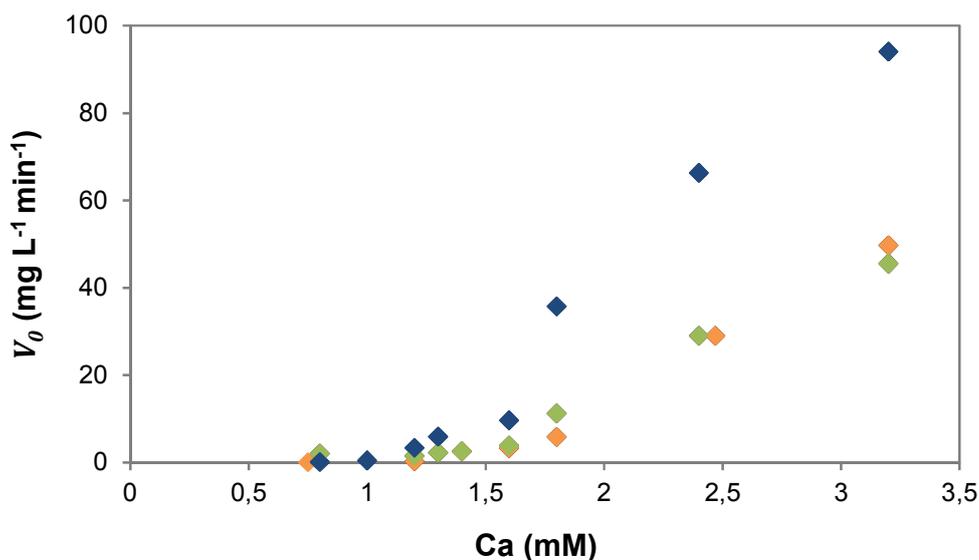


Figura 4.4. Influencia de la concentración de Calcio sobre la velocidad inicial de la reacción de agregación a pH 5 (◊), 7 (◊) y 9 (◊).

La Figura 4.5 muestra una microfotografía óptica de los agregados de AH producidos a pH 7 y a una concentración 4 mM de calcio, luego de un largo tiempo de reacción (aproximadamente 60 min). Se observan agregados de estructuras abiertas. La Figura muestra, por ejemplo, un gran agregado en forma de Y de alrededor de 100 μm , compuesto de subunidades más pequeñas de 20-30 μm . Dos de estas subunidades están marcadas en la Figura, una de ellas (a) formando parte del agregado en forma de Y, y otra (b) sin formar parte del mismo. Además, estas subunidades parecen estar compuestas de agregados aún más pequeños (dos de ellos se indican con flechas en la figura) de 1-5 μm . La observación del sistema con el microscopio reveló que las subunidades y los agregados más pequeños son bastante móviles, sujetos a movimiento de tipo browniano, y que las estructuras grandes, como el agregado en forma de Y, son continuamente formadas y destruidas, con subunidades entrando o dejando los agregados continuamente. La arquitectura jerárquica de los agregados observada en la Figura 4.5 parece ser bastante usual para AH (31), y los resultados obtenidos con el microscopio óptico complementan los hallazgos obtenidos por otros autores que utilizaron magnificaciones mayores. Baalousha et al. (6), por ejemplo, reportaron la presencia de agregados de 1-5 nm de un AH del río Suwannee (SRHA) en soluciones de CaCl_2 observadas por microscopía electrónica de transmisión.

Estos autores hicieron una revisión y análisis de los datos publicados, y concluyeron que los agregados de AH se forman por pequeñas unidades básicas de menos de 10 nm, y que el tamaño de los agregados es dependiente del pH y de la concentración de cationes divalentes. Ellos indicaron que cationes como el calcio incrementan la agregación a través de la formación de puentes intra- e intermoleculares entre las moléculas de AH cargadas negativamente.

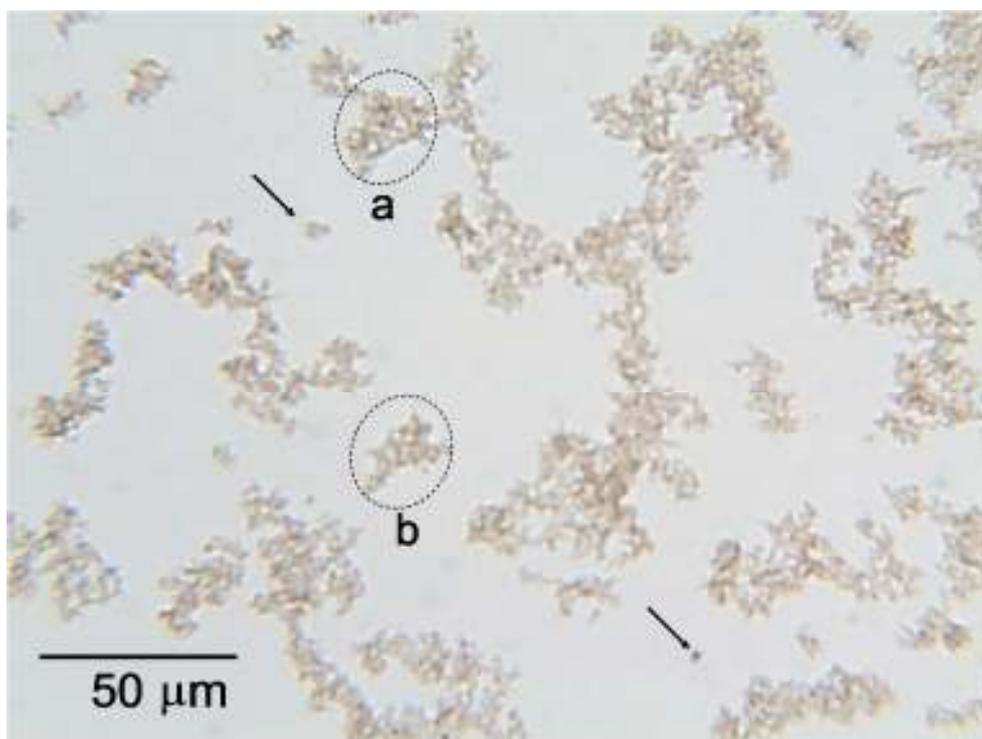


Figura 4.5. Microfotografía óptica de agregados de AH formados luego de 60 min (AH 50 mg L⁻¹; calcio 4 mM; pH 7). El círculo (a) muestra una subunidad que forma parte de un agregado más grande en forma de Y. El círculo (b) muestra una subunidad similar que se encuentra libre. Estas subunidades están formadas de agregados más pequeños (1-5 μm). Dos de estos pequeños agregados se indican con flechas.

Los datos presentados indican que la formación de agregados de AH a partir de moléculas de AH disueltas, en presencia de iones calcio, es bastante compleja. Procesos como la unión de calcio a moléculas de AH disueltas, nucleación y crecimiento de pequeños agregados, y uniones agregado-agregado para formar estructuras más grandes deberían estar involucrados. Un esquema simplificado del proceso descrito se indica en la Figura 4.6. El paso

inicial y desencadenante debería ser la unión de calcio a las moléculas disueltas de AH. Esta es una etapa rápida, que ocurre en un tiempo < 2 min, por lo que no es el paso determinante de la velocidad del proceso de agregación. Las moléculas formadas, $AHCa_x$, donde x representa un número promedio de iones calcio enlazados por molécula de AH, tienen una carga negativa menor y pueden formar núcleos o pequeños agregados, con iones calcio que actúan como puentes intermoleculares. Asimismo, estos núcleos o pequeños agregados pueden experimentar una posterior agregación y formar agregados más grandes.

Dado que el segundo o tercer paso representados en la Figura 4.6 son más lentos que la unión de calcio, parecen ser determinantes de la velocidad, por lo que la velocidad de agregación dependerá de la eficiencia de las colisiones entre las moléculas $AHCa_x$ o pequeños agregados. Esta eficiencia puede entenderse como una combinación de fuerzas repulsivas de largo alcance debido al potencial zeta negativo de las moléculas y a fuerzas de enlace de corto alcance debido a la presencia de iones calcio en las moléculas. Si el potencial zeta es altamente negativo, habrá una barrera electrostática importante entre las moléculas o pequeños agregados que se aproximan entre sí, y por lo tanto las colisiones serán bastante ineficientes. Esto ocurre cuando la concentración de calcio está por debajo de 1 mM (CCC), donde la agregación es insignificante. A concentraciones de calcio iguales o por encima de este valor, el potencial zeta se vuelve menos negativo y por lo tanto dos entidades que se aproximen tienen mayor probabilidad de entrar en contacto permitiendo que el calcio enlazado actúe como puente entre ellas. Bajo estas condiciones, las colisiones son más eficientes y la agregación ocurre en mayor medida. Es interesante notar que por encima de la CCC la velocidad de agregación aumenta linealmente con la concentración de calcio, aunque el potencial zeta permanezca casi constante. Bajo estas condiciones, el incremento en la eficiencia de las colisiones es debido principalmente a un incremento en la cantidad de calcio enlazado al AH, más que a una disminución en la repulsión electrostática entre las entidades que se aproximan. A mayor número de iones calcio enlazado por molécula, mayor es la probabilidad de formación de puentes catiónicos intermoleculares. Una explicación similar podría darse para la mayor velocidad de agregación a pH 9

comparada con la velocidad a pH 5 o 7. El potencial zeta es independiente del pH a todas las concentraciones de calcio estudiadas, por lo que la mayor velocidad de agregación a pH 9 debería ser consecuencia de una mayor unión de calcio a los AH a este valor de pH. El hecho que la cantidad de calcio unido a los AH aumente a pH 9 ya fue mostrado en el Capítulo 2 a partir de las isotermas de adsorción de calcio a AH.

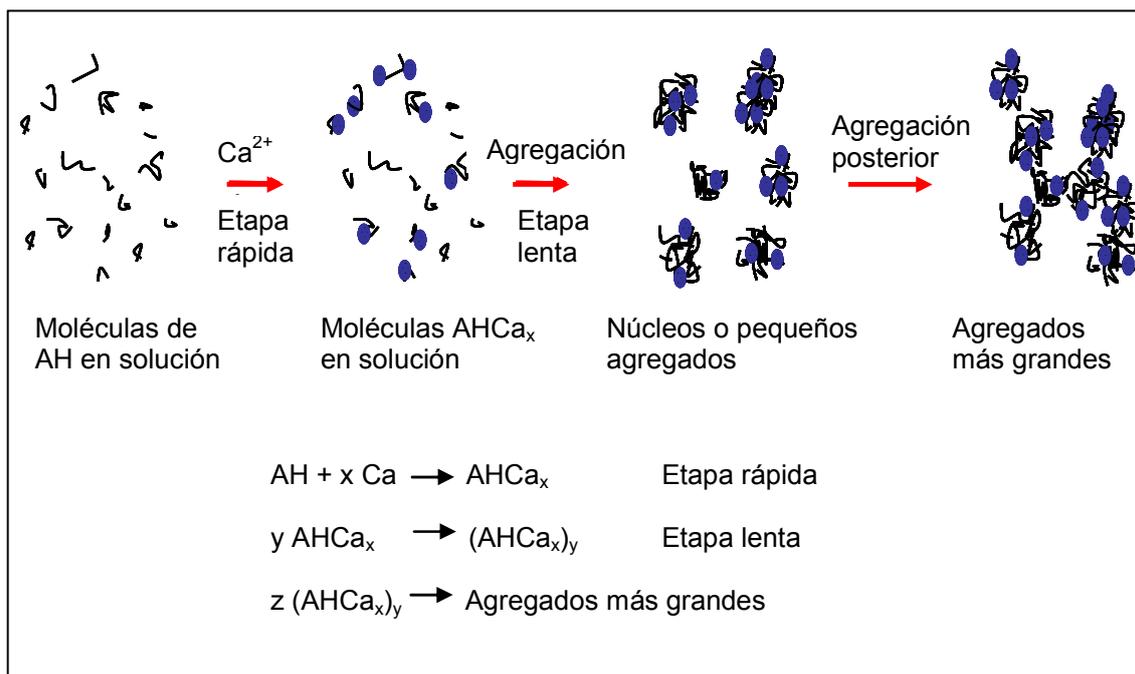


Figura 4.6. Representación esquemática de los pasos involucrados en el proceso de agregación de AH en presencia de iones calcio (representados como esferas azules). El diagrama no es a escala.

Es aceptado en la actualidad que los AH son una mezcla compleja de moléculas con propiedades espectroscópicas diferentes (17). Tal como se indicó en el capítulo 2, la relación E2/E3 (relación entre la absorbancia de una solución de AH a 250 nm y a 365 nm) da información sobre la aromaticidad de los AH, siendo inversamente proporcional a la misma (32) (33); por ejemplo, muestras con baja relación E2/E3 tienen mayores componentes aromáticos y viceversa. Es útil evaluar el valor de E2/E3 a medida que procede la agregación, dado que puede obtenerse información sobre el fraccionamiento del AH. La Figura 4.7 muestra la curva E2/E3 vs. α para todas las experiencias cinéticas realizadas. Notablemente, todos los datos describen una única curva,

indicando que el comportamiento es el mismo bajo todas las condiciones experimentales exploradas. E2/E3 permanece casi constante e igual a la relación E2/E3 de la muestra de AH original hasta un valor de $\alpha \approx 0,6$ y luego aumenta con el aumento de α . Esto indica que no hay fraccionamiento (es decir no hay agregación preferencial de algunos componentes de AH) hasta que un 60 % de las moléculas iniciales forman agregados, pero por encima de este valor los agregados se vuelven más ricos en componentes aromáticos.

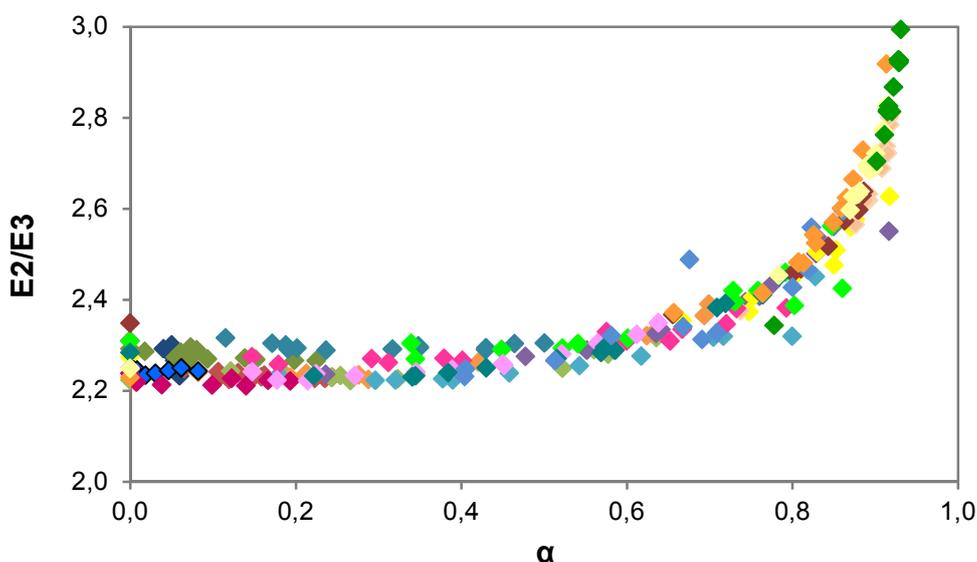


Figura 4.7. Relación E2/E3 vs. α para todas las condiciones experimentales estudiadas.

No hay datos en la literatura que consideren la evolución de E2/E3 durante un proceso de agregación de AH. Sin embargo, hay datos sobre fraccionamiento en la adsorción de AH sobre partículas de óxido en condiciones de equilibrio. Janot et al. (32), por ejemplo, encontraron una adsorción preferencial de componentes aromáticos sobre α -Al₂O₃ a pH 6,8, lo cual, de acuerdo a los autores está en acuerdo con otros datos de la literatura. Kang y Xing (34), por lo contrario, encontraron un efecto opuesto para la adsorción de un AH sobre goethita. Nuestros resultados sobre cinética de agregación de AH son diferentes a ambos resultados sobre adsorción. En vez de ello, observamos que no ocurre agregación preferencial, al menos hasta un valor de $\alpha \approx 0,6$, por lo cual no podemos dar explicaciones concluyentes. Quizá la presencia de iones calcio en nuestro sistema de agregación es un factor

clave para explicar el comportamiento observado. Aunque el AH es una mezcla compleja de moléculas, todas tienen una cierta cantidad de grupos ionizables capaces de enlazar calcio, y por lo tanto todas tienen una habilidad similar de formar puentes calcio intermoleculares y agregados sin preferencia. Se requiere más investigación al respecto para ampliar el conocimiento sobre esta temática.

4.4. Conclusiones

La velocidad de agregación del AH aumenta significativamente con el aumento de la concentración de calcio en el rango de pH 5-9. El estudio cinético permite postular un mecanismo de reacción, donde la unión de iones calcio ocurre rápidamente, seguida por una formación lenta de núcleos o pequeños agregados de moléculas $AHCa_x$. También ocurre una agregación posterior que lleva a la formación de agregados grandes que pueden ser observados con un microscopio óptico y aún a simple vista. La unión de iones calcio al AH juega dos roles clave en el proceso de agregación: disminuye las fuerzas repulsivas entre las moléculas de AH por su potencial zeta menos negativo, y origina la formación de puentes calcio entre dos moléculas que se aproximan.

A partir de los datos cinéticos se halló una concentración de coagulación crítica de $1,0 \pm 0,2$ mM de calcio, la cual es similar a los valores de CCC obtenidos por otros autores en estudios de coagulación en el equilibrio. Por lo tanto, la presencia de calcio y quizá otros cationes di- o trivalentes en medios naturales, es fundamental para mantener la estabilidad de los agregados de AH. Los resultados presentados en este capítulo son importantes para los sistemas medioambientales, implican que a una alta concentración de calcio el AH puede agregarse rápidamente y entrapar temporariamente, proteger y transportar moléculas orgánicas, iones metálicos, pesticidas u otros contaminantes. La dinámica del proceso de agregación-desagregación de AH debería jugar un rol importante en el transporte y protección de contaminantes en el medioambiente. Además, es sabido que la unión de iones polivalentes como el calcio produce la estabilización de la materia orgánica del suelo, por lo

que los resultados pueden ser importantes para entender el secuestro y stock de carbono en suelos calcáreos.

4.5. Bibliografía

1. Swift RS. 1999. Macromolecular properties of soil humic substances. Fact, fiction, and opinion. *Soil Science*. 164:790–802.
2. D'Orazio V & Senesi N. 2009. Spectroscopic properties of humic acids isolated from the rhizosphere and bulk soil compartments and fractionated by size exclusion chromatography. *Soil Biology and Biochemistry*. 41:1775–1781.
3. Conte P & Piccolo A. 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33:1682–1690.
4. Sutton R & Sposito G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39:9009–9015.
5. Avena MJ & Wilkinson KJ. 2002. Disaggregation kinetic of a peat humic acid: mechanism and pH effects. *Environ. Sci. Technol.* 36:5100–5105.
6. Baalousha M, Motelica-Heino M, Le Coustumer P. 2006. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 272:48-55.
7. Olk DC. 2006. A chemical fractionation for structure-function relations of soil organic matter in nutrient cycling. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 70:1013–1022.
8. Zhou P, Yan H, Gu B. 2005. Competitive complexation of metal ions with humic substances. *Chemosphere*. 58:1327–1337.
9. Schauman GE, Thiele-Bruhn S. 2011. Molecular modeling of soil organic matter: squaring the circle. *Geoderma*. 166:1–14.
10. Terashima M, Tanaka S, Fukushima M. 2007. Coagulation characteristics of humic acid modified with glucosamine or taurine. *Chemosphere*. 69:240–246.
11. Tombácz E. 1999. Colloidal properties of humic acids and spontaneous changes of their colloidal state under variable solution conditions. *Soil Science*. 164:814–824.
12. Pédrot M, Dia A, Davranche M. 2010. Dynamic structure of humic substances: rare earth elements as a fingerprint. *Journal of Colloid and Interface Science*. 245:206–213.
13. Brigante M, Zanini G, Avena M. 2009. Effects of pH, anions and cations on the dissolution kinetic of the humic acid particles. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 347:180-186.
14. Christl I & Kretzschmar R. 2007. C-1s NEXAFS spectroscopy reveals chemical fractionation of humic acid by cation-induced coagulation. *Environ. Sci. Technol.* 41:1915–1920.

15. Kucerík J, Drastík M, Zmeskal O, Ctvrtnícková A. 2009. Ultrasonic spectroscopy and fractal analysis in the study on progressive aggregation of humic substances in diluted solutions. *WSEAS Transactions on Environment and Development*. 11:705–715.
16. Brigante M, Zanini G, Avena M. 2007. On the dissolution kinetics of humic acid particles: effects of pH, temperature and Ca concentration. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 294:64–70.
17. Molina FV. 2014. *Soil Colloids properties and ion binding*. CRC Press. pp 545.
18. Alvarez-Puebla RA & Garrido JJ. 2005. Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states. *Chemosphere*. 59:659-667.
19. Tipping E. 2002. *Cation Binding by Humic Substances*. New York : Cambridge University.
20. Kalinichev AG, Iskrenova-Tchoukova E, Ahn WY, Clark MM, Kirkpatrick RJ. 2011. Effects of Calcium on supramolecular aggregation of natural organic matter in aqueous solutions: A comparison of molecular modeling. *Geoderma*. 169:27-32.
21. Town RM, van Leeuwen, HP, Buffle J. 2012. Chemodynamics of soft nanoparticulate complexes: Cu(II) and Ni(II) with fulvic acid and aquatic humic acids. *Environ. Sci. Technol*. 46:10487–10498.
22. Yamashita Y, Tanaka T, Adachi Y. 2013. Transport behaviour and deposition kinetics of humic acids under acidic conditions in porous media. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 417:230–235.
23. Sparks DL. 2003. *Environmental Soil Chemistry*. Amsterdam Academic Press.
24. Majzik A & Tombácz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions II. Colloidal interactions: charge state, dispersing and/or aggregation of particles in suspension. *Organic Geochemistry*. 38:1330–1340.
25. Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Koopal LK, Borkovec M, Benedetti MF, Avena MJ. 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 151:147-156.
26. Milne CG, Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Tipping E. 2003. Generic NICA-Donnan model parameters for metal-ion binding by humic substances. *Environ. Sci. Technol*. 37:958–971.
27. Marang L, Eidner S, Kumke M, Benedetti M, Reiller P. 2009. Of the competitive binding of Eu(III), Ca(II) and Cu(II) to a sedimentary Spectroscopic characterization originated humic acid. *Chemical Geology*. 264:154–161.
28. Stumm W & Morgan JJ. 1970. *Aquatic Chemistry. An Introduction Emphasizing Chemical Equilibria in Natural Waters*. New York. Wiley-Interscience.
29. Wall NA & Chopin GR. 2003. Humic acid coagulation: influence of divalent cations. *Applied Geochemistry*. 18:1573–1582.

30. Hong S & Elimelech M. 1997. Chemical and physical aspects of natural organic matter (NOM) fouling of nanofiltration membranes. *Journal of Membrane Science*. 132:159–181.
31. Chilom G & Rice JA. 2009. Organo-clay complexes in soils and sediments. En: Senesi N, Xing B Min Huang P. *Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems*. New Jersey: John Wiley. pp 876.
32. Janot L, Reiller PE, Zheng X, Croué JP, Benedetti MF. 2012. *Water Res*. 46:731–740.
33. Peuravuori J & Pihlaja K. 1997. Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Analytica Chimica Acta*. 337:133–149.
34. Kang S & Xing B. 2008. Humic acid fractionation upon sequential adsorption onto goethite. *Langmuir*. 24:2525–2531.

Capítulo 5. Interacción del Ácido Húmico y la Fracción Arcilla: Adsorción y Agregación Superficial

5.1. Introducción

Las moléculas de AH pueden interactuar con la superficie de las partículas de minerales modificando la humectabilidad, la carga superficial y la agregación de las partículas (1), afectando de esta forma la erosión y la fertilidad del suelo, y el transporte de nutrientes y contaminantes en suelos y aguas naturales. La formación de complejos AH-arcilla, por asociación de los AH a la fracción mineral del suelo es, además, reconocida como un proceso con un impacto significativo sobre la conservación de materia orgánica y el secuestro de carbono (2) (3). Estos complejos AH-arcilla tienen el potencial de contribuir a la reducción de emisiones de gases con efecto invernadero por acumulación de materia orgánica en la fase sólida (3) (4).

La adsorción de AH a las partículas minerales del suelo depende de las propiedades de la materia orgánica y de la superficie de los minerales (5). Sobre óxidos de hierro y aluminio, por ejemplo, la adsorción ocurre principalmente por intercambio de ligando, donde los grupos carboxilatos y otros grupos funcionales del AH actúan como ligandos que sustituyen los grupos hidroxilo o acuo inicialmente enlazados a cationes hierro o aluminio en la superficie (3) (6). En medio neutro o ácido la adsorción es usualmente favorecida por atracción electrostática entre las moléculas de AH cargadas negativamente y la superficie de los óxidos de hierro o aluminio cargados positivamente. En contraste, las moléculas de AH son repelidas electrostáticamente por las partículas de minerales de arcilla, tales como montmorillonita, kaolinita e illita, las cuales usualmente tienen cargas estructurales negativas debido a sustituciones isomórficas. Aunque alguna reacción de intercambio de ligando puede ocurrir en los bordes de los minerales de arcilla, la interacción con las superficies basales es usualmente obstaculizada a menos que las cargas negativas sean reducidas por electrolitos como NaCl a altas concentraciones (7). Sin embargo, en presencia de cationes di- o trivalentes hay una adsorción muy alta de AH sobre los minerales de arcilla, basada principalmente en la formación de puentes catiónicos (5) (8) (9) (10) (11). En presencia de iones calcio, por ejemplo, la adsorción de AH sobre partículas de arcilla aumenta enormemente en comparación con sodio (10).

Tal como se mostró en el capítulo anterior, las moléculas de AH también pueden interaccionar entre ellas originando agregados moleculares. La

agregación puede ser muy importante para el secuestro de carbono en el suelo porque la acumulación de materia orgánica no está limitada a la disponibilidad de superficies minerales libres, como ocurre con la adsorción. Aunque desde un punto de vista tradicional se considera que los AH están formados por moléculas poliméricas relativamente grandes, hay un consenso creciente en que los AH son ensamblados supramoleculares de moléculas de tamaño pequeño a grande, las cuales forman asociaciones dinámicas estabilizadas por interacciones hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y presencia de iones metálicos, especialmente iones di o trivalentes (12) (13). Tal agregación de AH es el resultado de interacciones moleculares que dependen de condiciones medioambientales como pH, fuerza iónica, presencia de iones metálicos multivalentes, compuestos orgánicos y partículas sólidas. La agregación en presencia de cationes se ve usualmente favorecida por una disminución del pH de la solución, dado que la protonación de grupos funcionales conlleva una disminución de la repulsión electrostática entre las moléculas (14) (15). En presencia de cationes multivalentes, la agregación es promovida por neutralización de carga y formación de puentes catiónicos entre diferentes moléculas de AH (16). Como se demostró en el Capítulo 4 de esta tesis, la unión de calcio al AH parece jugar dos roles importantes en el proceso de agregación: por un lado disminuye las fuerzas repulsivas entre las moléculas, por disminución del potencial zeta negativo, mientras que por otro lado induce la formación de puentes calcio entre dos moléculas de AH que se aproximan (17). Este acercamiento facilitado de moléculas de AH permite también que ocurran interacciones por puente hidrógeno que ayudan a mantener la unión entre las moléculas (18).

Aunque la adsorción de AH sobre la superficie de minerales y la agregación de AH son procesos frecuentemente estudiados y reportados en la literatura, es escasa la información que se posee sobre la agregación superficial de AH, es decir, el proceso en el cual la agregación de AH ocurre en la superficie de un sólido, tal como la superficie de un mineral. Como sucede usualmente en los procesos naturales, la superficie del mineral actúa como centro de nucleación para la formación de una nueva fase (19), y por lo tanto es posible que la agregación de AH se vea favorecida por la presencia de esta superficie. En un estudio de adsorción de AH sobre montmorillonita, Majzik y

Tombácz (7) sugieren que la precipitación de AH podría ocurrir a altas concentraciones de calcio. Los autores proponen que el calcio induce la adsorción de AH por formación de puentes calcio entre la montmorillonita y las moléculas de AH, induciendo también la formación de una segunda capa de AH unido, con puentes calcio entre las moléculas de AH de la primera y la segunda capa. Tampoco se excluye en este proceso la precipitación superficial de AH, donde las moléculas se agregan o precipitan masivamente sobre la superficie del sólido. Si bien las propuestas de Majzik y Tombácz (7) son muy coherentes y físicamente posibles, se requieren todavía muchos más estudios para obtener información esclarecedora de estos procesos y para conocer sus mecanismos.

El objetivo de este capítulo es estudiar la interacción entre un AH y la fracción arcilla obtenida de un suelo agrícola. Los efectos del calcio sobre el comportamiento de adsorción/agregación del AH son evaluados a partir de medidas de potencial zeta, microscopía e isothermas de adsorción de AH y de calcio. La posibilidad de agregación superficial es especialmente abordada e investigada.

5.2. Materiales y Métodos

La fracción arcilla y el AH utilizados en esta sección fueron extraídos de un mismo suelo agrícola. Los procedimientos de extracción y purificación ya fueron descritos en los capítulos 2 y 3.

5.2.1. Medidas de potencial zeta (ζ)

Para obtener información de la interacción electrostática entre las moléculas de AH y las partículas de la fracción arcilla, se midió el potencial zeta bajo diferentes condiciones experimentales, con un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Se realizaron dos tipos de experimentos: (a) medidas de potencial zeta vs. pH, a fuerza iónica constante, con NaCl o CaCl₂ como electrolito soporte, y (b) medidas de potencial zeta vs. concentración de CaCl₂ a pH 7. Estos dos tipos de experimentos se realizaron con la fracción arcilla, con el AH y con el sistema mezcla fracción arcilla más AH. Para las medidas de potencial zeta vs. pH se utilizaron, 50 mL de una suspensión de fracción arcilla

de 1 g L^{-1} , 50 mL de una solución de AH 50 mg L^{-1} , o 50 mL de una suspensión conteniendo 1 g L^{-1} de fracción arcilla y 50 mg L^{-1} de AH. Se colocó la suspensión/solución correspondiente en una celda de reacción con el electrolito soporte (FI=0,01). El pH se ajustó a 10 con NaOH y se equilibró el sistema bajo agitación continua (450 rpm). Luego de la medida de potencial zeta, el pH se disminuyó adicionando un pequeño volumen de HCl, y el potencial zeta se midió nuevamente después de 10 min. Este procedimiento se repitió hasta llegar a un valor de pH 3. Para las medidas de potencial zeta vs. concentración de CaCl_2 , alícuotas de 10 mL de los tres sistemas mencionados previamente se colocaron en sendos tubos y el pH se reguló a 7. Diferentes volúmenes de una solución de CaCl_2 se adicionaron a los tubos para lograr un rango de concentraciones desde 0 a 3 mM. Después de 12 h de equilibrio, se reguló nuevamente el pH a 7 y se midió el potencial zeta. La desviación estándar típica del potencial zeta fue de $\pm 1,5 \text{ mV}$, obtenida a partir de 10 medidas repetidas de la misma muestra.

5.2.2. Isotermas de adsorción

Las isotermas de adsorción del AH sobre la fracción arcilla se realizaron a pH 7, en NaCl 0,01 M, a diferentes concentraciones de calcio. Se preparó una serie de tubos de centrífuga conteniendo 15 mL de una suspensión 2 g L^{-1} de fracción arcilla en NaCl 0,01 M, y diferentes volúmenes de una solución de AH $0,5 \text{ g L}^{-1}$ (también en NaCl 0,01 M), de modo tal que la concentración inicial de AH varió entre 0 y 160 mg L^{-1} . La concentración de calcio se ajustó adicionando un volumen conocido de una solución stock de CaCl_2 0,05 M, y el pH se reguló con soluciones de NaOH y HCl. Se realizaron en total 9 isotermas a diferentes concentraciones de calcio: 0; 0,5; 0,8; 1,0; 1,2; 1,4; 1,6; 1,8 y 2,4 mM. Los tubos se agitaron durante 24 h, se centrifugaron por 5 min a 5000 rpm, y el sobrenadante se filtró con una membrana de $0,45 \mu\text{m}$ de tamaño de poro, para asegurar una completa separación de la fase sólida. Finalmente se cuantificaron las concentraciones de AH y de calcio remanentes en el sobrenadante.

El AH se cuantificó por espectrofotometría UV-visible, a 500 nm, con un espectrofotómetro Metrolab 1600 o un espectrofotómetro de arreglo de diodos Agilent 8453. Se realizaron curvas de calibración a pH 7 y a 500 nm, con

soluciones de AH en un rango de 0 a 60 mg L⁻¹. Para asegurar una cuantificación espectrofotométrica aceptable, es importante verificar que la forma de los espectros de AH no cambia al variar la concentración de AH o después de un proceso de adsorción/agregación. El comportamiento espectrofotométrico del AH en los experimentos fue verificado comparando: i) el espectro de la muestra de AH disuelto a diferentes concentraciones, ii) el espectro del AH en solución luego de agregación inducida por calcio (en ausencia de la fracción arcilla), y iii) el espectro del AH en solución luego de adsorción/agregación sobre la fracción arcilla en presencia de iones calcio. Los resultados (5.6. Anexo) muestran que en todos los casos el espectro normalizado fue el mismo, indicando que la cuantificación espectrofotométrica es factible y aceptable. En algunos casos, también se chequearon errores en la cuantificación debido a posibles cambios en la forma del espectro, comparando la cuantificación a 350 y a 500 nm.

El calcio se cuantificó por titulación con EDTA (ácido etilen-di-amino-tetra-acético) utilizando calcón (CAS 2538-85-4) como indicador. El método cuantifica la concentración de calcio total en el sobrenadante, esto es, iones calcio libres en la solución más iones calcio enlazados a las moléculas de AH que permanecen en solución. Esto último se evaluó por titulación de una solución de calcio de concentración conocida (1,4 mM) con concentraciones variables de AH, desde 5 a 220 mg L⁻¹. La concentración evaluada mediante titulación resultó ser 1,4 ± 0,03 mM (n=12) independientemente de la concentración de AH.

El AH y el calcio adsorbidos se calcularon a partir de la ecuación 5.1:

$$\Gamma = \frac{(c_i - c)V}{m} \quad \text{Ecuación 5.1.}$$

Donde Γ es Γ_{AH} (AH adsorbido) o Γ_{Ca} (calcio adsorbido), c_i es la concentración inicial de AH o calcio, c es la concentración de AH (c_{AH}) o calcio (c_{Ca}) que permanecen en el sobrenadante luego del equilibrio, m es la masa de fracción arcilla y V el volumen final de la mezcla.

Los experimentos de adsorción mencionados permitieron graficar isotermas de adsorción de AH (Γ_{AH} vs. c_{AH}) a diferentes concentraciones de

calcio, y además construir curvas Γ_{AH} vs. c_{Ca} y Γ_{Ca} vs. c_{Ca} para las diferentes concentraciones de AH.

5.2.3. Microscopía óptica

Se tomaron microfotografías para obtener mayor información de las interacciones entre las moléculas de AH, las partículas de la fracción arcilla y los iones calcio. Se utilizó un microscopio óptico (Hokenn), equipado con un software para análisis de micro imágenes, para examinar muestras bajo diferentes condiciones experimentales. Los sistemas a observar se prepararon de manera similar a los empleados en el experimento de adsorción. Se utilizaron tres tubos de centrífuga con 15 mL de una suspensión de la fracción arcilla 2 g L^{-1} y 100 mg L^{-1} de AH en NaCl. En cada tubo se ajustó la concentración de calcio adicionando un volumen conocido de solución stock $0,05 \text{ M}$, para lograr concentraciones de 0 , $0,5$ y $1,6 \text{ mM}$. El pH se reguló a 7 con NaOH o HCl. Luego de agitar los tubos durante 24 h , una gota de cada suspensión se colocó sobre un portaobjetos y se observó con el microscopio óptico.

5.3. Resultados y Discusión

La Figura 5.1 muestra el efecto del pH sobre el potencial zeta de la fracción arcilla, del AH y de la fracción arcilla más el AH. El potencial zeta es negativo en todos los casos. Para la fracción arcilla en NaCl, el potencial zeta es de alrededor de -20 mV a pH 3 y se vuelve monótonamente más negativo hasta un valor de -30 mV a pH 10 . Este comportamiento es predecible para la fracción inorgánica de suelo donde silicoaluminatos y filosilicatos dominan la composición (20) (21), y resulta de la presencia de cargas estructurales negativas sobre los minerales de arcilla y de la creciente deprotonación de grupos superficiales a medida que aumenta el pH (22). En CaCl_2 el potencial zeta de la fracción arcilla es siempre menos negativo que en NaCl. Es aproximadamente -7 mV a pH 3 y llega a ser de alrededor de -12 mV a pH alto. Esta disminución en el valor negativo del potencial zeta cuando el calcio está presente es muy probablemente causada por la adsorción de los cationes divalentes en la superficie de los minerales (7). En el caso del AH, el potencial

zeta en NaCl es de alrededor de -22 a pH 3, cambia hasta -37 mV a pH 5 y luego permanece casi constante hasta pH 10. Este es un comportamiento conocido para los AH, y resulta principalmente de la deprotonación de grupos carboxílicos y fenólicos (5) (13) (23) con el aumento del pH, dado que son los grupos ionizables más abundantes en los AH. Aunque alguna deprotonación extra podría ocurrir a $\text{pH} > 9$ debido a la presencia de grupos fenólicos menos abundantes, esto no se evidenció en las curvas de potencial zeta vs. pH. En presencia de CaCl_2 el potencial zeta del AH es siempre menos negativo que en NaCl, permaneciendo en alrededor de -15 mV en todo el rango de pH estudiado, como consecuencia de la unión de calcio a las moléculas de AH, unión que se demostró en muchas publicaciones (24). El sistema fracción arcilla más AH se comporta como los dos anteriores, el potencial zeta es menos negativo a todos los valores de pH en presencia de calcio, lo cual puede ser atribuido a la unión de iones calcio tanto a las partículas de los minerales como a las moléculas de AH (7) (19).

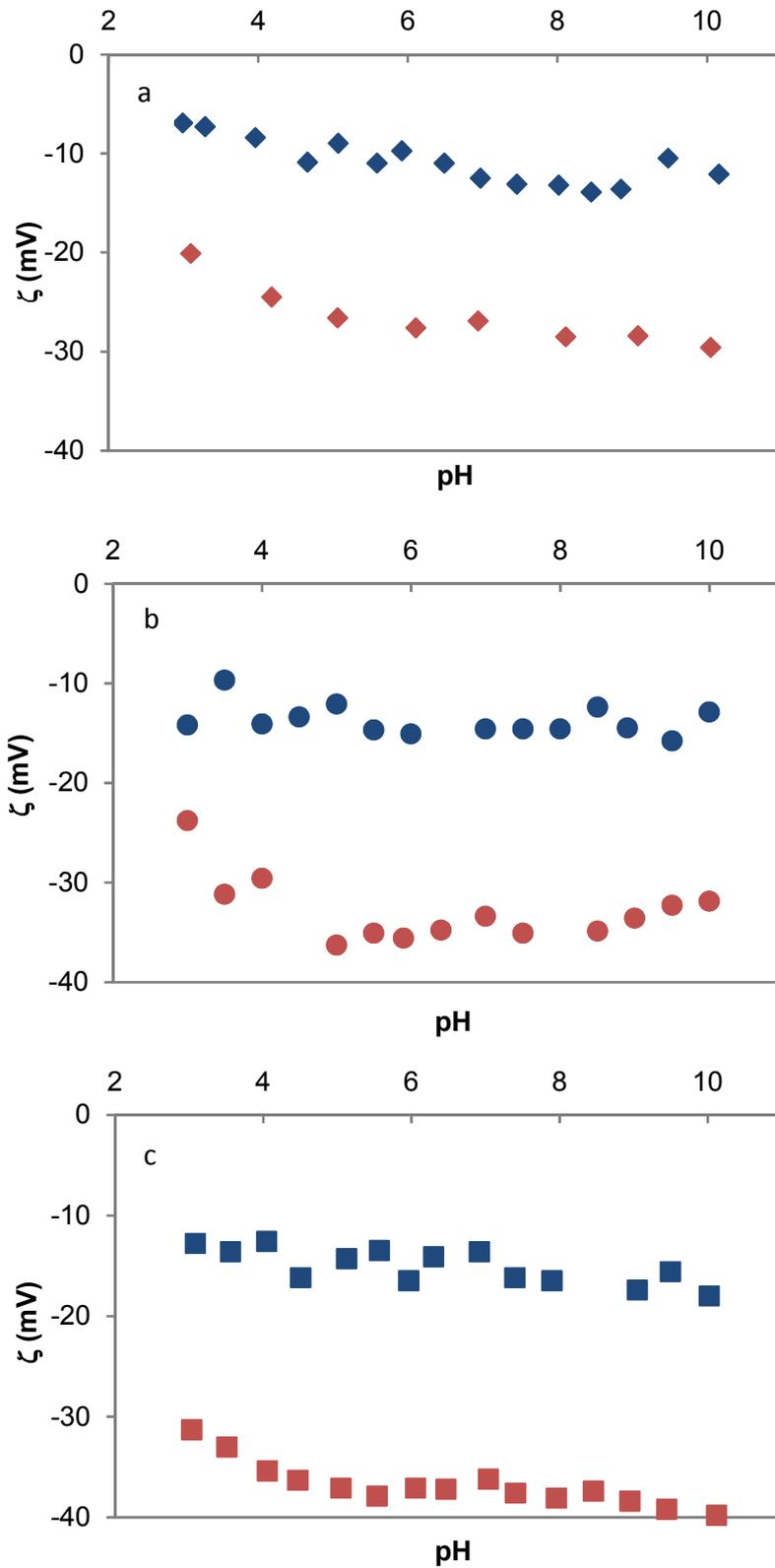


Figura 5.1. Potencial zeta de la fracción arcilla (a), del AH (a), y de la fracción arcilla más AH (c), en presencia de NaCl (series de color rojo) y CaCl_2 (series de color azul). (FI=0,01)

La Figura 5.2 muestra los efectos de la concentración de calcio a pH 7 sobre el potencial zeta de la fracción arcilla, del AH y del sistema fracción arcilla más AH. El comportamiento es bastante similar en todos los casos: el potencial zeta tiene un valor negativo relativamente alto en ausencia de calcio y se vuelve menos negativo con el incremento de la concentración de dicho elemento. Los efectos del calcio son bastante significativos hasta una concentración 1,5 mM, donde el potencial zeta es de alrededor de -18 mV. Por encima de esta concentración el efecto es menos importante y el potencial zeta alcanza un valor de -15 mV con 3 mM. Aunque la unión de iones calcio disminuye la carga negativa de las partículas minerales y de las moléculas de AH, haciendo que el potencial zeta sea menos negativo en los tres sistemas, es claro que el calcio no es capaz de revertir la carga negativa. Los resultados obtenidos son similares a los reportados por Majzik y Tombácz (7) para el potencial zeta de un AH a varias concentraciones de calcio y pH 6,5, y son similares a nuestros resultados previos para un AH en presencia de calcio a tres pH diferentes (16).

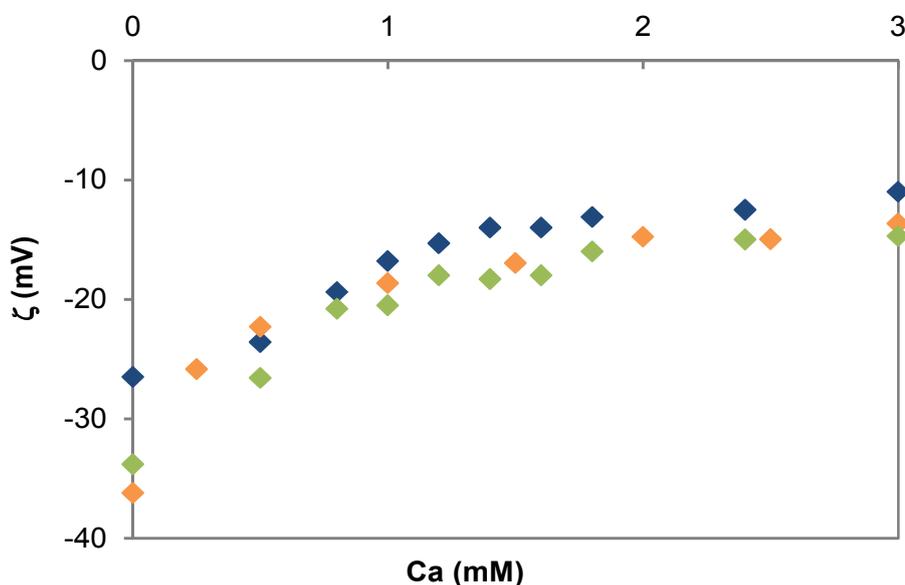


Figura 5.2. Influencia de la concentración de calcio sobre el potencial zeta de la fracción arcilla (◆), del AH (◆) y de la fracción arcilla más AH (◆).

La Figura 5.3 muestra las isotermas de adsorción del AH sobre la fracción arcilla a diferentes concentraciones de calcio. La adsorción del AH es

muy baja en ausencia de calcio, alcanzando un valor de 15 mg g^{-1} a altas concentraciones de AH. Tanto las moléculas de AH como las partículas de la fracción arcilla están cargadas de forma negativa, tal como se observó en las medidas de potencial zeta, por lo que las interacciones electrostáticas repulsivas impiden una buena adsorción. La adsorción medida podría ocurrir en los bordes de las partículas de los minerales de arcilla, como observaron diferentes autores para la adsorción de AH sobre montmorillonita y kaolinita (7) (25) (26), y/o en la superficie de algunos óxidos de hierro y aluminio, los cuales son buenos adsorbentes de AH (15) (24) (27) (28) (29) (30) (31). Sin embargo estos óxidos están presentes en pequeñas proporciones en la fracción arcilla del suelo, por lo que no puede esperarse que la adsorción de AH sea elevada.

La Figura 5.3 muestra que el calcio afecta significativamente la adsorción del AH, la cual aumenta con el aumento de la concentración del catión. Un efecto importante del calcio en la adsorción del AH fue observado por varios autores para la adsorción sobre sólidos puros (9) (19) (32) (33) (34). Majzik y Tombácz (7) por ejemplo, observaron un incremento en la adsorción de AH sobre una montmorillonita por aumento de la concentración de calcio. Ellos atribuyeron este comportamiento a la adsorción de iones calcio sobre el mineral por intercambio iónico y a la subsecuente formación de puentes catiónicos entre la superficie de la montmorillonita y las moléculas de AH. Estos autores también propusieron la formación de una segunda capa de AH sobre la superficie cubierta, como resultado de la formación de puentes calcio entre moléculas de AH de la primera y segunda capas, sugiriendo además que el AH podía precipitar sobre la superficie del sólido formando complejos húmico-calcio. Martínez et al. (20), por otra parte, propusieron que el incremento en la concentración de calcio resultaba en una estructura más compacta de las moléculas de AH, llevando a una mayor adsorción de sustancias húmicas en minerales tales como kaolinita e illita. Además, Akbour et al. (10), quienes trabajaron con arenas de cuarzo y kaolinita, indicaron que la adsorción de cationes divalentes reduce la carga negativa de los húmicos y la carga superficial negativa de los sólidos, aumentando, en consecuencia, la adsorción de AH. Por su parte, Molina (5) muestra ejemplos de experimentos de adsorción donde la presencia de cationes multivalentes como cobre y plomo forman puentes entre SH y minerales, favoreciendo la interacción. Los

resultados presentados en la Figura 5.3 están en concordancia con todas estas explicaciones, por lo que pueden ser entendidos en términos de una combinación de los siguientes procesos: (a) la presencia de calcio reduce la repulsión electrostática (reducción del potencial zeta, tal como se observa en las Figuras 5.1 y 5.2) entre el AH y la superficie de los minerales, favoreciendo la interacción; (b) la adsorción de iones calcio sobre la superficie de las partículas promueve la formación de puentes calcio entre las partículas de los minerales y el AH; (c) la compactación de las moléculas de AH conlleva a una alta densidad de adsorción de AH; y (d) la precipitación superficial o agregación superficial de AH puede ser posible a altas concentraciones de calcio. Considerando este último proceso, es conocido que el calcio tiene la habilidad de producir la agregación de las moléculas de AH por encima de una cierta concentración crítica del catión. De hecho, en el Capítulo 4 se demostró que el AH aquí utilizado comienza a agregarse significativamente a una concentración de calcio $1,0 \pm 0,2$ mM, en NaCl 0,01 M y ausencia de partículas sólidas. Esta concentración es la concentración crítica de coagulación (CCC) de calcio para el AH en solución. Por lo tanto, es posible que a altas concentraciones de calcio ocurra agregación de AH además de adsorción. Las isothermas presentadas en la Figura 5.3, si bien brindan valiosa información acerca de la remoción de AH por la fracción mineral, no permiten identificar en qué condiciones ocurre agregación y en qué condiciones ocurre adsorción de AH. Estas condiciones tratarán de establecerse mediante los siguientes análisis.

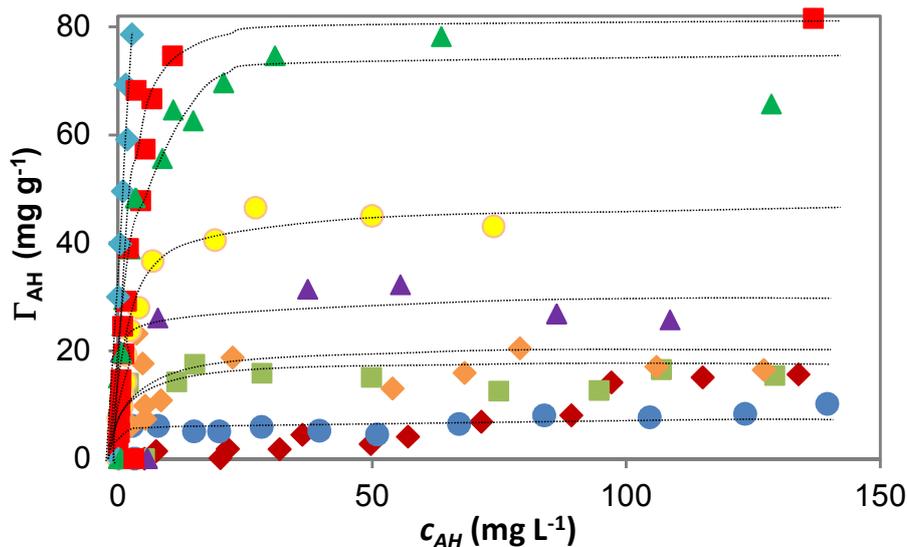


Figura 5.3. Isotermas de adsorción del AH sobre la fracción arcilla a diez concentraciones diferentes de calcio total: 0 (◆), 0,5 (●), 0,8 (■), 1,0 (◇), 1,2 (▲), 1,4 (●), 1,6 (▲), 1,8 (■) y 2,4 (◆) mM.

La Figura 5.4 muestra curvas Γ_{AH} vs. c_{Ca} para cinco concentraciones diferentes de AH. Al parecer, esta forma de graficar los datos no ha sido reportada hasta el momento. Una inspección general de las curvas indica que la adsorción aumenta linealmente (línea 1) hasta una $c_{Ca}=0,7$ mM, y por encima de esta concentración las curvas de adsorción adquieren una pendiente más pronunciada (línea 2). Para las concentraciones de AH más bajas que se investigaron (25 y 50 mg L⁻¹), las curvas de adsorción nunca alcanzan la pendiente más pronunciada porque todo el AH en el sistema está ya adsorbido (marcado con líneas punteadas horizontales en la Figura 5.4) antes de que esta condición se alcance. En los demás casos, la presencia de una pendiente pronunciada en las curvas es evidente a c_{Ca} por encima de 0,7 mM, hasta que las curvas alcanzan una meseta debido a la remoción completa del AH desde la solución. Las dos pendientes diferentes sugieren que dos procesos diferentes están operando y controlando la remoción de húmico. Uno de estos procesos es la adsorción de AH asistida por iones calcio, la cual ocurre a c_{Ca} por debajo de 0,7 mM. Esta adsorción de AH probablemente es impulsada por la reducción en la repulsión electrostática entre la superficie del sólido y las moléculas de AH, y por la formación de puentes calcio entre la superficie y el AH. La agregación de moléculas de AH que permanecen en solución no tendría

que ser significativa bajo estas condiciones porque la concentración de calcio es considerablemente más baja que la necesaria para la agregación del AH (CCC), especialmente en la parte inicial de las curvas. El segundo proceso podría ser la agregación del AH, la cual probablemente ocurre junto con la adsorción de AH a c_{Ca} por encima de 0,7 mM, originando curvas con una pendiente más pronunciada. Aunque un valor de c_{Ca} 0,7 mM está levemente por debajo de la CCC del AH en ausencia de partículas sólidas, la agregación comienza en este valor de c_{Ca} en presencia de la fracción arcilla. Este fenómeno es bastante común, la superficie sólida actúa como centro de nucleación, favoreciendo la agregación, precipitación o formación de una nueva fase en la superficie (18). Aunque es bastante difícil discriminar entre agregación inducida por iones calcio en solución previo a la adsorción de los agregados, y agregación directa sobre la superficie (agregación superficial), es posible inferir que la agregación encima de la adsorción sería el proceso que prevalece, siguiendo el análisis realizado por Schneider et al. (35). De acuerdo a estos autores, la agregación luego de la adsorción es posible si hay una acumulación de iones calcio dentro de la parte difusa de la doble capa eléctrica. La acumulación de iones calcio ocurrirá porque hay una carga neta negativa sobre la superficie sólida. Entonces, aun aunque la concentración de calcio en solución podría ser menor que la CCC para la agregación del AH, esta concentración crítica se excede cerca de la superficie sólida por lo que ocurre agregación directa sobre la superficie.

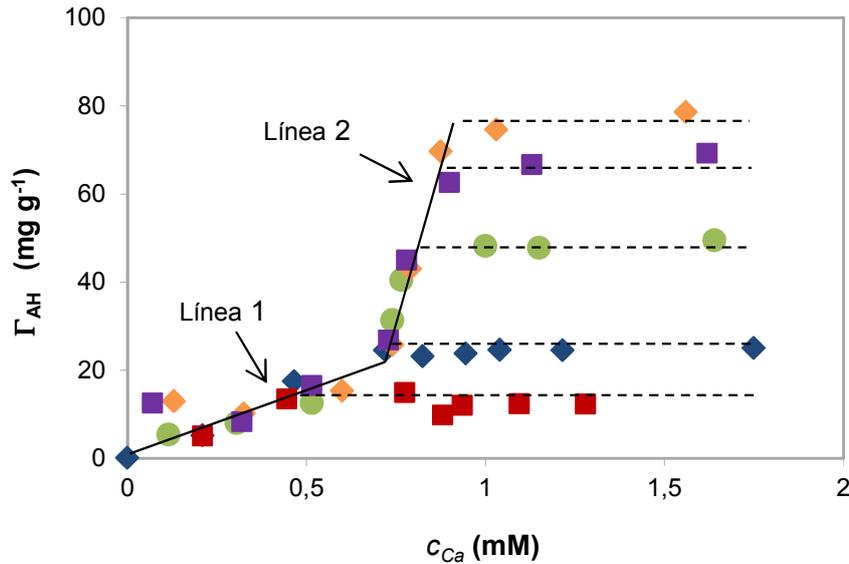


Figura 5.4. Adsorción de AH (Γ_{AH}) en función de la concentración de calcio (c_{Ca}) a cinco concentraciones diferentes de AH: 25 (■), 50 (◆), 100 (●), 140 (▲) y 160 (◆) mg L⁻¹. Las líneas punteadas horizontales indican la condición de adsorción completa de AH para cada una de estas concentraciones.

La formación de agregados puede ser confirmada fácilmente con un microscopio óptico. La Figura 5.5 muestra las imágenes de la fracción arcilla sin AH en el sistema, con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 1 en la Figura 5.4, y con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 2. Sin AH en el sistema, se observan partículas simples que corresponden a la fracción arcilla. El mismo tipo de imagen se obtiene bajo las condiciones de la línea 1, en acuerdo con el hecho de que la remoción de AH es solo debido a adsorción, una monocapa o sub-monocapa de AH adsorbido no puede ser detectada por microscopía óptica, o aun con magnificaciones más altas. Sin embargo, bajo las condiciones de la línea 2, la presencia de agregados de AH puede ser detectada claramente en forma de pequeños puntos (flechas en la Figura 5.5). Muchos de estos agregados se agrupan juntos en la superficie de las partículas de los minerales, y son producto de la agregación superficial. Otros agregados se observan separados de la superficie de las partículas. Se conoce que los agregados son bastante móviles en agua y están sujetos a movimiento Browniano (16), por lo que ellos podrían haberse formado como agregados superficiales y luego por movimientos térmicos haberse desprendido de la superficie. También podrían ser producto de una agregación masiva de AH en

solución a altas concentraciones de AH, por encima de la CCC, sin la necesidad de una superficie sólida para la nucleación.

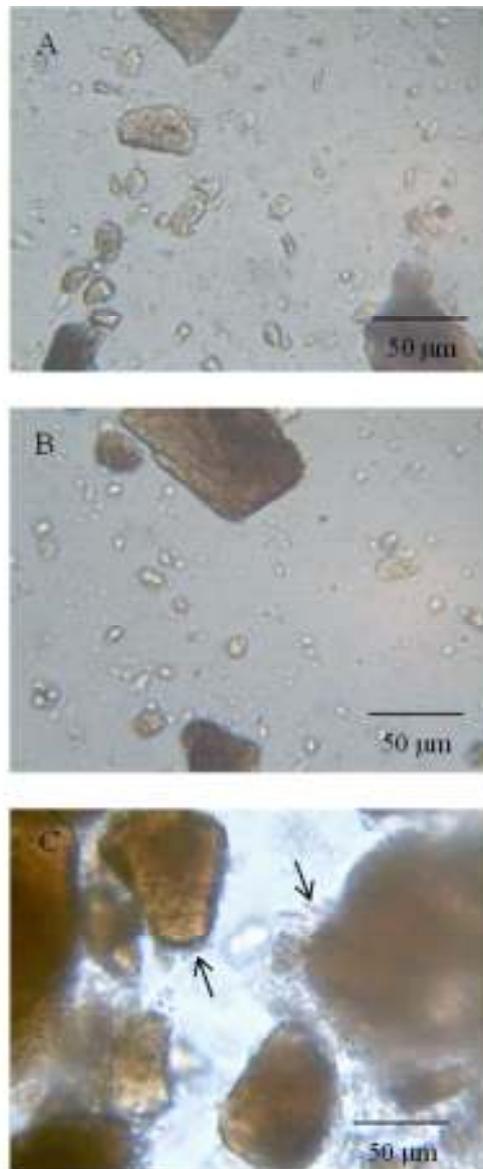


Figura 5.5. Microfotografías ópticas de la fracción arcilla: (A) sin AH en el sistema, (B) con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 1 en la Figura 5.4, y (C) con AH y calcio bajo las condiciones de la línea 2. Las flechas indican la presencia de agregados de AH.

La Figura 5.6 muestra curvas Γ_{Ca} vs. c_{Ca} para la serie de experimentos indicados en la Figura 5.4. Dado que el calcio se enlaza tanto a la superficie de los minerales como a las moléculas de AH, Γ_{Ca} representa el calcio unido a la superficie más el calcio unido al AH adsorbido/agregado. Primero se analizarán

dos casos extremos para describir la Figura 5.6: (a) la adsorción de calcio en ausencia de AH y (b) la adsorción de calcio en presencia de la máxima concentración de AH estudiada, 160 mg L^{-1} . En ausencia de AH una curva Γ_{Ca} vs. c_{Ca} es directamente la isoterma de adsorción de iones calcio sobre la fracción arcilla. El calcio se adsorbe con el incremento de su concentración en solución, alcanzando un valor de adsorción de $0,29 \text{ mmol g}^{-1}$, o $0,58 \text{ meq g}^{-1}$, lo cual se corresponde casi exactamente con el valor de CIC de la fracción arcilla ($57 \text{ cmol}_c \text{ Kg}^{-1}$ ó $0,57 \text{ meq g}^{-1}$). En presencia de 160 mg L^{-1} de AH, Γ_{Ca} comienza siendo más bajo que en ausencia de AH, pero luego aumenta bastante abruptamente originando una curva con forma de S, con un punto de inflexión a $c_{\text{Ca}} \approx 0,70 \text{ mM}$, y llegando a un valor de Γ_{Ca} mucho más alto que en ausencia de AH. El incremento abrupto en la Γ_{Ca} ocurre a la misma concentración de calcio que desencadena la agregación (Figura 5.4), lo que sugiere que es consecuencia del consumo de iones calcio por agregación superficial del AH. Por otra parte, la disminución en la Γ_{Ca} a baja c_{Ca} cuando el AH está presente en el sistema puede ser entendida fácilmente como una competencia por los iones calcio entre la superficie de las partículas de los minerales y las moléculas de AH disueltas. En estas condiciones, una fracción importante del AH permanece disuelta en solución y por lo tanto el calcio adsorbido disminuye, debido a que parte del mismo se encuentra enlazado a las moléculas de AH disueltas. Un proceso de competencia similar ocurre a altas c_{Ca} . Sin embargo, bajo esta condición, la mayor parte del AH está adsorbido o agregado, por lo que retiene una gran cantidad de iones calcio y origina un incremento en Γ_{Ca} . Las mismas explicaciones son válidas para entender las otras curvas en la Figura 5.6, las que corresponden a situaciones intermedias entre los dos casos extremos analizados, debido a que la concentración de AH está entre las concentraciones de estos dos casos.

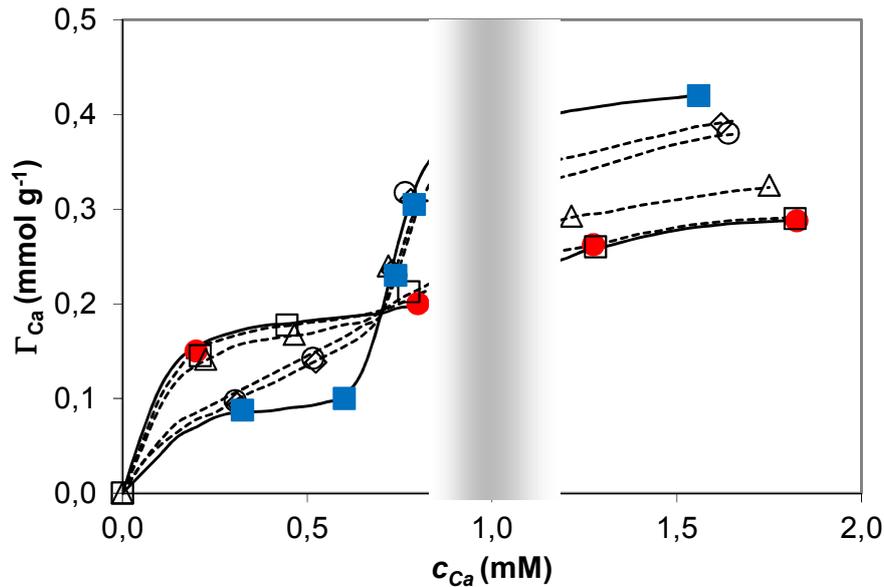


Figura 5.6. Γ_{Ca} vs. c_{Ca} a diferentes concentraciones de AH total: 0 (●), 25 (□), 50 (△), 100 (○), 140 (◇), y 160 (■) mg L⁻¹. La barra gris indica el valor de c_{Ca} donde el AH empieza a agregarse en solución.

Es interesante destacar que todas las curvas en la Figura 5.6 parecen definir un punto de entrecruzamiento a $c_{Ca} \approx 0,70$ mM, lo cual se corresponde con $\Gamma_{Ca} \approx 0,19$ mmol g⁻¹. Este es un punto de inflexión que se vuelve evidente para las curvas obtenidas con concentraciones de AH mayor a 50 mg L⁻¹. La presencia de este punto de cruce significa que una concentración variable de AH no produce ningún cambio en c_{Ca} ni en Γ_{Ca} en esas condiciones. Este punto se corresponde con un balance entre el calcio en solución, representado por c_{Ca} (calcio disuelto en agua más calcio enlazado al AH disuelto, es decir todas las formas de calcio que permanecen en el sobrenadante luego de centrifugar y filtrar) y el calcio en fase sólida, representado por Γ_{Ca} (calcio adsorbido a la superficie de los minerales, enlazado al AH adsorbido y enlazado al AH agregado, ya sea en la superficie o liberado de la superficie, es decir todas las formas de calcio que podrían separarse por centrifugación y filtrado). Por lo tanto, para el sistema estudiado, la adición de AH a la suspensión de la fracción arcilla no cambiará la partición de iones calcio entre la solución y la fase “sólida” si $c_{Ca} \approx 0,70$ mM. Sin embargo, si $c_{Ca} < 0,70$ mM, la adición de AH favorece la presencia de iones calcio en solución, y si $c_{Ca} > 0,70$ mM la adición

de AH favorecerá la presencia de iones calcio en la fase “sólida”. Esto ayuda a entender la forma de las curvas en la Figura 5.6.

Como se mencionó en la sección 5.1. Introducción, hay un creciente consenso en que el AH es un ensamblado supramolecular de moléculas pequeñas a grandes, lo cual contradice la visión más tradicional que considera al AH como un polielectrolito. Es entonces interesante analizar si los experimentos de agregación y adsorción en presencia de calcio, tal como se realizaron en este capítulo, dan alguna información sobre esta estructura. La principal respuesta puede obtenerse del análisis de los espectros UV-visible del AH, que indican que ni la agregación con calcio ni la adsorción/agregación a la superficie de las partículas de los minerales en presencia de calcio cambia la forma de los espectros. En ausencia de una cantidad importante de calcio u otro catión multivalente, Andrew et al. (36) por ejemplo, demostraron que la materia orgánica oceánica disuelta se adsorbe preferentemente a longitud de onda larga (visible) adsorbiendo y emitiendo (fluorescencia) material sobre un cartucho extractor C18, sugiriendo el fraccionamiento del material en diferentes componentes, y apuntando a la estructura supramolecular de la materia orgánica disuelta. Considerando nuestros resultados, parece que el calcio no discrimina entre fracciones relativamente grandes y relativamente pequeñas de AH, probablemente debido a la habilidad de formar puentes entre ellas. Entonces, la agregación, la agregación superficial y la adsorción mediada por iones calcio ocurren de forma bastante homogénea. Por lo tanto, cualquier intento de fraccionar los constituyentes de AH debería realizarse en completa ausencia de calcio y probablemente otros cationes polivalentes.

5.4. Conclusiones

Se investigó el efecto de la concentración de calcio sobre la interacción entre el AH y la fracción arcilla de una misma muestra de suelo. El calcio juega un rol clave en la interacción ya que es capaz de enlazar tanto sitios superficiales de la superficie de los minerales como grupos funcionales en las moléculas del AH, disminuyendo el potencial zeta negativo en ambos casos y favoreciendo la interacción. En ausencia de iones calcio, la adsorción de AH sobre la fracción arcilla es muy baja como resultado de la repulsión

electrostática entre la superficie y las moléculas de AH. En presencia de iones calcio, hay un consumo significativo de AH por el mineral. La concentración de calcio determina si ocurre principalmente adsorción o agregación de AH. Bajas concentraciones de calcio favorecen la adsorción de AH, la cual ocurre por formación de puentes calcio entre la superficie de los minerales y las moléculas de AH. Altas concentraciones de calcio inducen la agregación de AH, la cual lleva a una remoción importante del AH disuelto. La agregación de AH puede ser detectada de manera consistente con curvas del tipo Γ_{AH} vs. C_{Ca} , a partir del cambio en la pendiente de las curvas y con gráficos Γ_{Ca} vs. C_{AH} a partir del punto de entrecruzamiento de las curvas. Este tipo de curvas nunca han sido empleadas para detectar la agregación de AH hasta el momento. La agregación, por último, puede ser fácilmente observada por microscopía óptica. Esta agregación se favorece por la presencia de una superficie mineral que actúa como centro de nucleación.

Los resultados obtenidos son potencialmente útiles para el entendimiento de la retención de materia orgánica por las partículas de suelo y la formación de agregados, procesos relacionados con la estructura del suelo y su resistencia a la erosión.

5.5. Bibliografía

1. Stevenson FJ. 1985. Geochemistry of soil humic substances. En: Humic substances in soil, sediment and water. Eds: Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. New York: John Wiley & Sons. pp 692.
2. Laird DA, Martens DA, Kingery WL. 2001. Nature of Clay-Humic Complexes in an Agricultural Soil. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 65(5):1413-1418.
3. Chilom G & Rice JA. 2009. Organo-clay complexes in soils and sediments. En: Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Eds: Senesi N, Xing B, Min Huang P. New Jersey: John Wiley. pp 876.
4. De Nobili M & Contin M. 2009. Carbon sequestration in soil. En: Biophysico-chemical processes involving natural nonliving organic matter in environmental systems. Eds: Senesi N, Xing B, Min Huang P. New Jersey: John Wiley. pp 876.
5. Molina FV. 2014. Soil Colloids properties and ion binding. CRC Press. pp 545.
6. Weng L, Van Riemsdijk WH, Hiemstra T. 2008. Humic Nanoparticles at the Oxide-Water Interface: Interactions with Phosphate Ion Adsorption. *Environ. Sci. Technol.* 42(23):8747-8752.
7. Majzik A & Tombacz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions I. Interfacial and aqueous phase equilibria: Adsorption and complexation. *Organic Geochemistry.* 38:1319–1329.
8. Heil D & Sposito G. 1993. Organic matter role in illitic soil colloids flocculation: I. Counter ions and pH. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 57:1241-1246.
9. Liu A & Gonzalez RD. 1999. Adsorption/desorption in a system consisting of humic acid, heavy metals, and clay minerals. *Journal of colloid and interface science.* 218:225-232.
10. Akbour RA, Douch J, Hamdani M, Schmitz P. 2002. Transport of Kaolinite Colloids through Quartz Sand: Influence of Humic Acid, Ca²⁺, and Trace Metals. *Journal of Colloid and Interface Science.* 253:1-8.
11. Feng X, Simpson AJ, Simpson MJ. 2005. Chemical and mineralogical controls on humic acid sorption to clay mineral surfaces. *Organic Geochemistry.* 36:1553-1566.
12. Conte P & Piccolo A. 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33:1682-1690.
13. Sutton R & Sposito G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view, *Environ. Sci. Technol.* 39(23):9009-9015.
14. Alvarez-Puebla RA & Garrido JJ. 2005. Effect of pH on the aggregation of a gray humic acid in colloidal and solid states. *Chemosphere* 59:659-667.

15. Baalousha M, Motelica-Heino M, Le Coustumer P. 2006. Conformation and size of humic substances: Effects of major cation concentration and type, pH, salinity, and residence time. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 272:48-55.
16. Tipping E. 2002. *Cation Binding by Humic Substances*. New York: Cambridge University.
17. Kloster N, Brigante M, Zanini G, Avena M. 2013. Aggregation kinetics of humic acids in the presence of calcium ions. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 427:76-82.
18. Kalinichev AG, Iskrenova-Tchoukova E, Ahn WY, Clark MM, Kirkpatrick RJ. 2011. Effects of Ca²⁺ on supramolecular aggregation of natural organic matter in aqueous solutions: A comparison of molecular modeling. *Geoderma* 169:27-32.
19. Stumm W. 1992. Processes at the mineral - water and particle - water interface in natural systems. En: *Chemistry of the soil - water interface*. New York: John Wiley and Sons. pp 428.
20. Martinez RE, Sharma P, Kappler A. 2010. Surface binding site analysis of Ca²⁺-homoionized clay-humic acid complexes. *Journal of Colloid and Interface Science.* 352:526-534.
21. Jiang C, Sèquaris JM, Vereecken H, Klumpp E. 2012. Effects of inorganic and organic anions on the stability of illite and quartz soil colloids in Na-, Ca- and mixed Na-Ca systems. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 415:134-141.
22. Tombacz E & Szekeres M. 2006. Surface charge heterogeneity of kaolinite in aqueous suspension. *Applied Clay Science.* 34:105-124.
23. Hosse M & Wilkinson KJ. 2001. Determination of Electrophoretic Mobilities and Hydrodynamic Radii of Three Humic Substances as a Function of pH and Ionic Strength. *Environ. Sci. Technol.* 35:4301-4306.
24. Kinniburgh DG, van Riemsdijk WH, Koopal LK, Borkovec M, Benedetti MF, Avena MJ. 1999. Ion binding to natural organic matter: competition, heterogeneity, stoichiometry and thermodynamic consistency. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 151:147-156.
25. Tombácz E. 2003. Effects of environmental relevant organic complexants on the surface charge and the interaction of clay mineral and metal oxide particles. En: *Role of interfaces in environmental protection*. Ed: Barany S. Netherlands: Kluwer academic publishers. pp 397-494
26. Furukawa Y, Watkins JL, Kim J, Curry KJ, Bennett RH. 2009. Aggregation of montmorillonite and organic matter in aqueous media containing artificial seawater. *Geochemical Transactions.* 10(2):1-11.
27. Antelo J, Arce F, Avena M, Fiol S, Lopez R, Macias F. 2007. Adsorption of a soil humic acid at the surface of goethite and its competitive interaction with phosphate. *Geoderma.* 138:12-19.
28. Ghosh S, Wang Z, Kang S, Bhowmik PC, Xing BS. 2009. Sorption and Fractionation of a Peat Derived Humic Acid by Kaolinite, Montmorillonite, and Goethite. *Pedosphere.* 19(1):21-30.

29. Illes E & Tombacz E. 2006. The effect of humic acid adsorption on pH-dependent surface charging and aggregation of magnetite nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*. 295:115-123.
30. Pedrot M, Le Boudec A, Davranche M, Dia A, Henin O. 2011. How does organic matter constrain the nature, size and availability of Fe nanoparticles for biological reduction? *Journal of Colloid and Interface Science*. 359:75-85.
31. Wershaw RL, Leenheer JA, Sperline RP, Song Y, Noll LA, Melvin RL, Rigatti GP. 1995. Mechanism of formation of humus coatings on mineral surfaces 1. Evidence for multidentate binding of organic acids from compost leachate on alumina. *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*. 96:93-104.
32. Indarawis K & Boyer TH. 2012. Alkaline Earth Metal Cation Exchange: Effect of Mobile Counterion. *Environ. Sci. Technol*. 46:4591–4598.
33. Jada A, Akbourn RA, Douch J. 2006. Surface charge and adsorption from water onto quartz sand of humic acid. *Chemosphere*. 64:1287–1295.
34. Kretzschmar R & Sticher H. 1997. Transport of Humic-Coated Iron Oxide Colloids in a Sandy Soil: Influence of Ca²⁺ and Trace Metals. *Environ. Sci. Technol*. 31:3497-3504.
35. Schneider IAH, Rubio J, Smith RW. 2001. Biosorption of metals onto plant biomass: exchange adsorption or surface precipitation?. *International Journal of mineral processing*. 62:111-120.
36. Andrew AA, Del Vecchio R, Subramaniam A, Blough NV. 2013. Chromophoric dissolved organic matter (CDOM) in the Equatorial Atlantic Ocean: Optical properties and their relation to CDOM structure and source. *Marine Chemistry*. 148:33-43.

5.6. Anexo

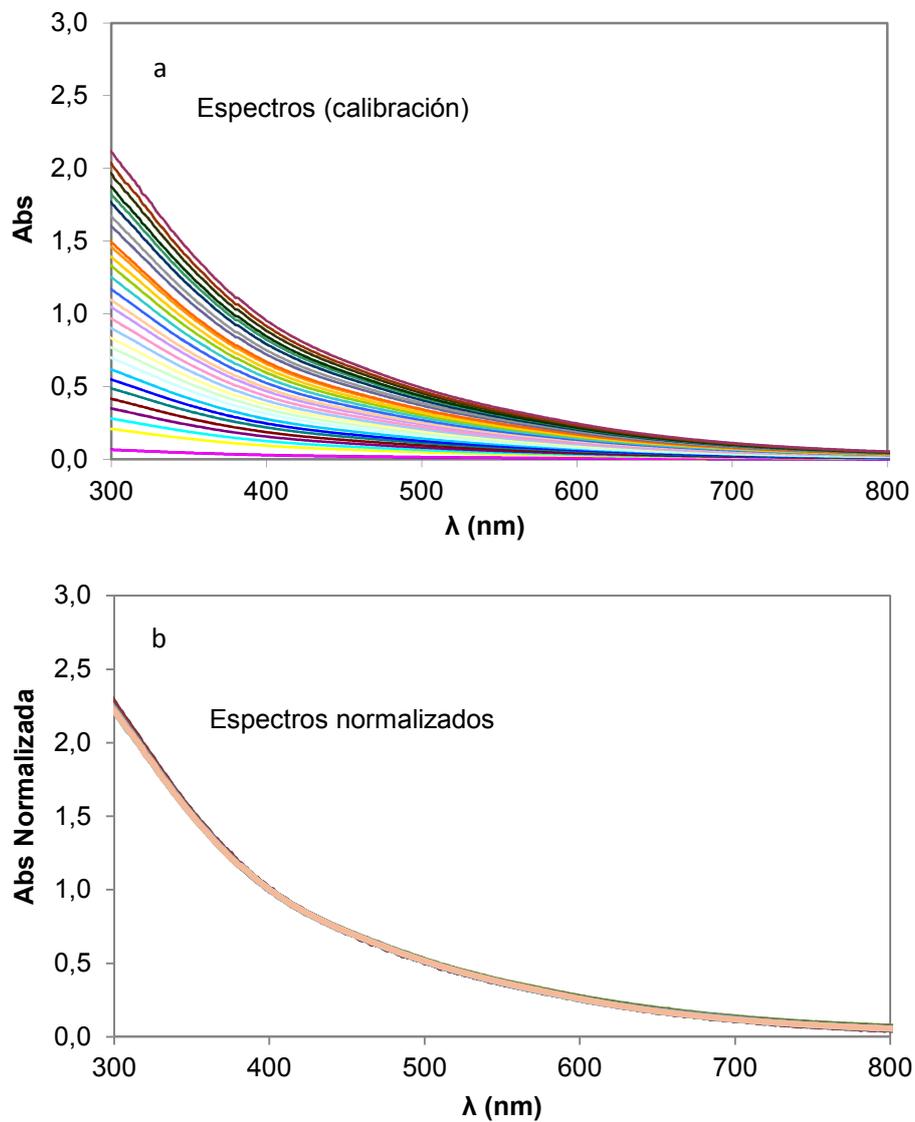


Figura 5A.1. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos para una curva de calibración con AH a pH 7. Concentración de AH entre 0 y 80 mg L⁻¹. La normalización fue realizada tal que la Abs sea igual a 1 a 400 nm.

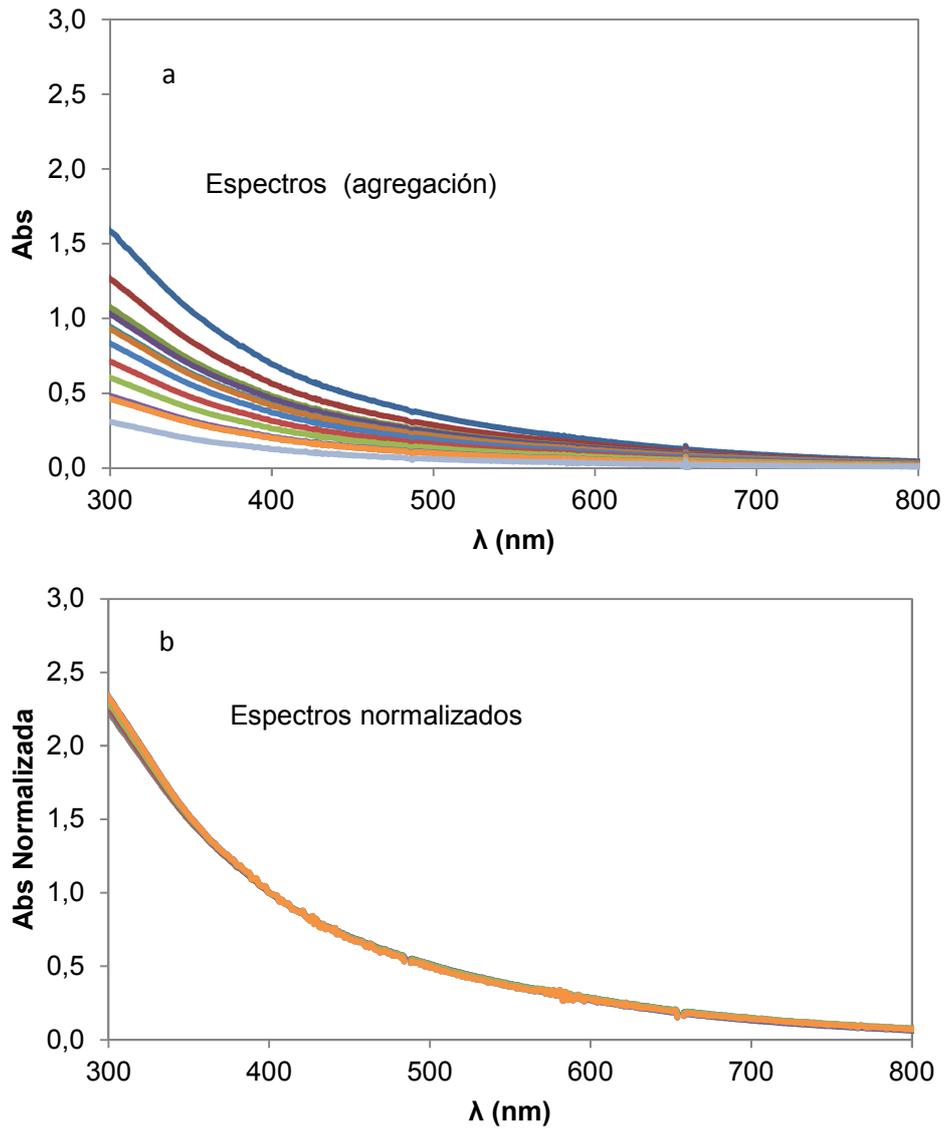


Figura 5A.2. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos en un experimento donde el AH fue agregado parcialmente por la adición de calcio. Los espectros corresponden a los sobrenadantes obtenidos luego de filtración. La agregación en este experimento varió desde 0 a 70 %. pH 7.

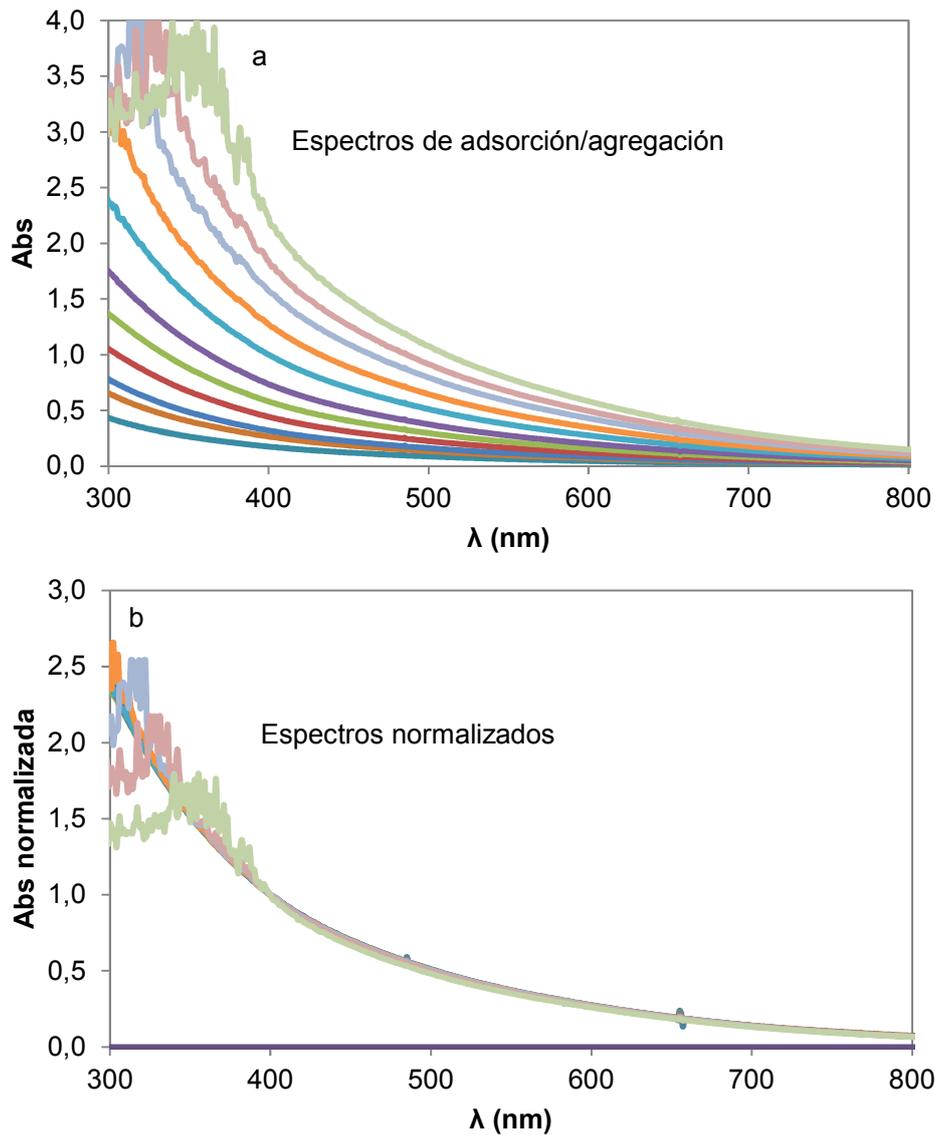


Figura 5A.3. Espectros del AH (a) y espectros normalizados del AH (b) obtenidos en un experimento donde el AH se adsorbió (agregó) sobre la superficie de la fracción arcilla del suelo. Las condiciones experimentales son las indicadas en la Figura 5.3, con una concentración de calcio total 0,5 mM. La remoción de AH desde la solución varió desde 0 a 90 %. Cuatro de los espectros de AH indicados en (a) y sus correspondientes espectros normalizados en (b) muestran ruido en la señal para Absorbancias mayores a ~ 3 (Tramitancia menor al 0,1 %) debido a limitaciones instrumentales.

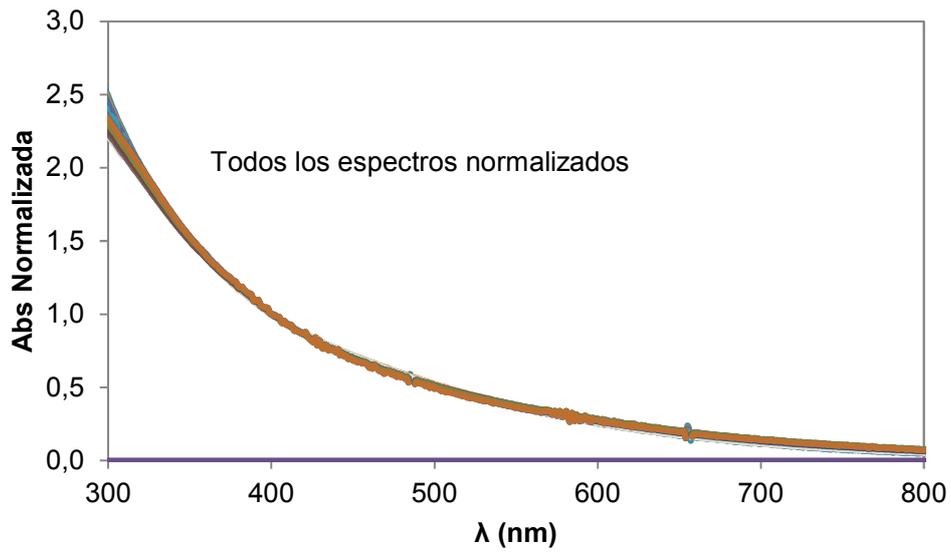


Figura 5A.4. Todos los espectros normalizados indicados en las Figuras 5A.1, 5A.2 y 5A.3. Los puntos por debajo de λ 390 nm correspondientes a los cuatro espectros normalizados que presentan ruido en la señal de la Figura 5A.3 no se muestran en esta figura para mayor claridad.

Capítulo 6. Estudio de Agregación / Sedimentación de la Fracción Arcilla del Suelo

6.1. Introducción

El comportamiento de dispersión – coagulación de suspensiones coloidales de arcillas y óxidos es de gran importancia en las ciencias del suelo y del medioambiente (1). La dispersión de partículas coloidales modifica la estructura de los agregados del suelo y contribuye a la erosión (2). Los coloides móviles en suelos y aguas sub-superficiales pueden facilitar el transporte de contaminantes adsorbidos ante un cambio en la composición química del suelo o el agua (3). Un gran número de estudios se han realizado para evaluar el comportamiento coloidal de arcillas puras, mezclas de arcillas, óxidos y arcillas naturales del suelo (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12). Se observa comúnmente que los coloides de arcillas naturales del suelo presentan una estabilidad coloidal más alta comparada con las arcillas puras. Esta estabilidad mejorada se atribuyó a la presencia de SH sobre la superficie de las arcillas naturales (1).

Como se mencionó en capítulos previos, las SH presentes en la superficie del suelo y en el ambiente acuático, son polielectrolitos amorfos de estructura química compleja. Si bien el tamaño y la estructura real de las moléculas están todavía en discusión (13) (14) (15) (16), es por todos aceptado que cada molécula posee varios grupos funcionales reactivos. Los grupos funcionales carboxílico y fenólico en su estructura le otorgan carga negativa y favorecen la formación de complejos con cationes metálicos. Cuando la concentración de cationes metálicos es superior a la concentración de coagulación crítica (CCC) las moléculas de AH forman agregados (17) (18). Además, se conoce que los complejos de SH con cationes metálicos pueden adsorberse a la superficie de las partículas minerales induciendo su agregación y sedimentación en medios naturales (18) (4) (19) (20) (21) (22). Esta adsorción de SH a las superficies de minerales en presencia de cationes produce modificación de la carga superficial de los coloides alterando la cinética del proceso de agregación – sedimentación (8) (23) (24).

La movilidad de las partículas en la solución del suelo y en aguas depende de su tendencia a permanecer en suspensión, por lo que una evaluación de su tendencia a la agregación permite predecir cuál será su velocidad de sedimentación y por lo tanto su remoción desde la fase acuosa. Se han publicado varios estudios sobre la tendencia a la agregación de partículas inorgánicas coloidales en presencia de SH (1) (7) (23). Sin embargo,

a la fecha solo se ha reportado un estudio de cinética de agregación de partículas minerales de tamaño arcilla ($< 2 \mu\text{m}$) extraídas de suelos agrícolas de Alemania, en presencia de iones calcio y sodio y AH (24). En éste estudio se demostró que hay un incremento en la agregación de las partículas con el incremento de la concentración de calcio desde 0,5 a 3 mM. Además, la presencia de una lámina delgada de carbono orgánico sobre la superficie de las partículas coloidales de suelo puede contribuir a la estabilización de las mismas a baja concentración de calcio. Se menciona un mecanismo de estabilización estérico debido a la interacción relativamente débil del carbono orgánico con la superficie de las partículas coloidales. Dado que este estudio se realizó sobre muestras de suelos de origen muy diferentes (Luvisol Ortico, Chernozem Áplico, Cambisol Dístrico) al suelo estudiado en esta tesis (Haplustol Éntico), resulta interesante evaluar si la agregación de los coloides sigue un comportamiento similar en este suelo.

La cinética de agregación de partículas se estudia en los últimos años principalmente por técnicas de dispersión de luz (light scattering) (12) (8) (25) (24) (26) (23). Con esa metodología, en general, se evalúa cómo varía el tamaño de los agregados que se van formando a medida que transcurre el tiempo y de allí se deduce en qué condiciones se produce o no agregación (8) (12) (26) (23). Sin embargo, las técnicas de dispersión de luz no están disponibles en todos los laboratorios, por lo que es deseable también contar con medios menos sofisticados para realizar este tipo de mediciones y que puedan ser aplicados en todos los laboratorios como análisis de rutina. En tal sentido, en varios trabajos se muestra que la agregación y sedimentación de partículas puede ser seguida por medidas relativamente simples de turbidez (7) (6) (11) (27), por lo que se explorará la eficacia de estas mediciones con la fracción arcilla del suelo estudiado en esta tesis.

El objetivo de este capítulo es profundizar el conocimiento del comportamiento de agregación / sedimentación de partículas de suelos realizando un estudio sobre la fracción arcilla del suelo de la Región Semiárida Pampeana Argentina que se ha estudiado en esta tesis. Se presenta una evaluación de la cinética del proceso en presencia de AH y cationes sodio y calcio. Para ello se midió la variación en la absorción de luz o turbidez durante estudios cinéticos de agregación / sedimentación, y se monitoreó la evolución

del tamaño de los agregados formados bajo diferentes condiciones experimentales.

6.2. Teoría

La agregación de partículas es normalmente analizada en términos de la colisión entre partículas primarias que quedan unidas luego de la colisión para formar un doblete de partículas (28) (29) (30). Subsecuentemente, los dobletes colisionan con partículas primarias o con otros dobletes para generar tripletes y cuadrupletes, los que a su vez, encuentran otras partículas para continuar creciendo. Finalmente, terminan generándose agregados macroscópicos que sedimentan y quedan segregados del medio.

En soluciones relativamente diluidas que están formando agregados las colisiones son esencialmente de naturaleza binaria. Por lo tanto la velocidad de agregación puede ser aproximada por una cinética de segundo orden (28) (26), descrita por:

$$-\frac{dn}{dt} = kn^2 \quad \text{Ecuación 6.1}$$

Donde n es la concentración partículas (en unidades de volumen⁻¹) y k es la constante de velocidad (unidades de volumen tiempo⁻¹).

La integración de la Ecuación 2 resulta ser:

$$\frac{1}{n} = \frac{1}{n_0} + kt \quad \text{Ecuación 6.2}$$

Donde n_0 es la concentración inicial de partículas. A partir del gráfico $1/n$ vs t se obtiene una recta de pendiente k y ordenada al origen $1/n_0$.

El valor de k , y por lo tanto la velocidad de agregación, está fuertemente determinada por la interacción entre las partículas. Si todas las colisiones son efectivas y resultan en la unión entre partículas se obtiene un valor máximo de constante de velocidad, k^{max} , y una velocidad de agregación máxima. En este caso, la velocidad de agregación está gobernada por la difusión de las partículas y su capacidad de encontrarse y colisionar unas con otras, por lo que

esta velocidad máxima de agregación tiene un control difusional. Por el contrario, cuando las partículas sienten una barrera de energía repulsiva entre ellas, sólo una fracción de las colisiones es efectiva, y esto se refleja en un menor valor de k y una menor velocidad de agregación.

Las velocidades de agregación son frecuentemente expresadas en términos relativos analizando lo que se conoce como relación de estabilidad, W , que se define como (1):

$$W = \frac{k^{max}}{k} \quad \text{Ecuación 6.3}$$

Un valor de $W=1$ indica que el sistema está controlado difusionalmente mientras que valores de W mayores a 1 indican que hay alguna barrera energética o alguna reacción que retardan la agregación (control por reacción). Otra manera de analizar las velocidades de agregación y la estabilidad de suspensiones coloidales es a través de la recíproca de W ($1/W$), conocido como la eficiencia de unión. Cuando $1/W=1$ todas las colisiones son efectivas y se tiene una velocidad máxima de agregación (control difusional); cuando $1/W<1$ no todas las colisiones son efectivas y la velocidad es menor.

En suspensiones coloidales, la “absorbancia” medida por un espectrofotómetro no resulta en realidad de la absorción de radiación por la muestra, como ocurre con cualquier solución coloreada, sino que es el resultado de la turbidez que se genera por la dispersión de luz. De todos modos, es posible trabajar con los datos de “absorbancia” ya que ésta está directamente relacionada con la turbidez de la misma según (31):

$$\tau = 2.303A/l \quad \text{Ecuación 6.4}$$

Donde τ es la turbidez, A la absorbancia y l es el paso óptico de la cubeta. A partir de medidas de A (o τ) de una suspensión que está formando agregados, la velocidad de agregación podría estimarse de dos maneras diferentes: a) empleando relaciones de concentración vs. tiempo; b) empleando relaciones de radio vs. tiempo.

En el caso a) se supone que la concentración de sólido en una suspensión es directamente proporcional a la turbidez. Esto es bien conocido, pero es estrictamente válido cuando la distribución de tamaños de partículas no varía durante las mediciones, ya que partículas o agregados de diferentes tamaños dispersan la radiación de manera diferente (31). En el caso de una suspensión cuyas partículas vayan cambiando de tamaño debido a colisiones que resultan en agregación, para que haya una dependencia lineal entre A (o τ) y la concentración de sólido es necesario suponer que los agregados que se forman sedimentan rápidamente y que no causan turbidez. Aunque esta suposición es grosera y puede que no se cumpla, se va tratar al sistema de esta manera a modo de comparación. Con esta suposición la velocidad de agregación puede redefinirse como:

$$-\frac{dc}{dt} = \alpha k C^2 \quad \text{Ecuación 6.5}$$

Donde C es la concentración de sólido (unidades de masa/volumen) y α es un factor de conversión entre n y C . La velocidad inicial de agregación viene entonces dada por:

$$-\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} = \alpha k C_0^2 \quad \text{Ecuación 6.6}$$

Donde C_0 es la concentración inicial de sólido.

A partir de la definición de $1/W$, este parámetro puede entonces conocerse calculando la relación entre la velocidad de agregación en cualquier condición experimental y la velocidad máxima de agregación (control difusional), siempre y cuando C_0 sea la misma en todos los casos.

$$\frac{1}{W} = \frac{k}{k^{max}} = \frac{\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}}{\left(\frac{dc}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}^{max}} \quad \text{Ecuación 6.7}$$

En el caso b) se supone que la agregación no resulta en sedimentación, al menos en las etapas iniciales del proceso. Los cambios en la turbidez son

por lo tanto asumidos como debidos a cambios en el tamaño de las partículas durante la agregación. Para una suspensión de partículas esféricas uniformes, con radio a y concentración n , la turbidez está dada por (30):

$$\tau = \frac{3\phi Q}{4a} \quad \text{Ecuación 6.8}$$

Donde ϕ es la fracción en volumen de las partículas ($4\pi n a^3/3$) y Q es el coeficiente de dispersión (*scattering coefficient*). El valor de Q depende del radio de las partículas y puede ser calculado a partir de la teoría de Mie (30). Para partículas grandes Q adquiere un valor constante igual a 2 (30). Por lo tanto, debido a que en una suspensión que está formando agregados ϕ es constante, un cambio en la turbidez es inversamente proporcional al radio de las partículas/agregados, el que se puede calcular a partir de:

$$a = \frac{3Q\phi}{4\tau} \quad \text{Ecuación 6.9}$$

La obtención del radio de las partículas a través de esta ecuación es también muy aproximada, ya que se suponen partículas (individuales y agregados) esféricas y que son suficientemente grandes como para que $Q=2$. Sin embargo, se va a usar esta aproximación para comparar con el caso a).

La velocidad de agregación de las partículas es en muchos casos seguida por dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering*). Se ha demostrado que la variación del radio de las partículas con el tiempo (a $t=0$) está dada por (1):

$$\left(\frac{da}{dt}\right)_{t \rightarrow 0} = \beta k n_0 \quad \text{Ecuación 6.10}$$

Donde β es una constante óptica que depende de n_0 , de la longitud de onda de la radiación, y de parámetros ópticos del sistema. El valor de $1/W$, por lo tanto puede calcularse a partir de la siguiente ecuación, siempre y cuando n_0 sea igual en todos los casos:

$$\frac{1}{W} = \frac{k}{k^{max}} = \frac{\left(\frac{da}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}}{\left(\frac{da}{dt}\right)_{t \rightarrow 0}^{max}}$$

Ecuación 6.11

6.3. Materiales y Métodos

6.3.1. Fracción arcilla y AH

Las muestras de fracción arcilla y AH son las mismas que se han estudiado durante todo este trabajo de tesis. Se preparó 100 mL de suspensión de fracción arcilla 1 g L⁻¹ transfiriendo un volumen medido de la suspensión extraída del suelo y llevando a volumen con NaCl 0,01 M. Se preparó también una solución madre de AH 1 g L⁻¹ a partir del AH liofilizado, para lo cual se pesó la masa necesaria de AH, se disolvió en solución acuosa a pH 12 bajo agitación constante, y finalmente se llevó a volumen de 100 mL.

6.3.2. Estudios de agregación y sedimentación empleando espectrofotometría UV-visible

El proceso de agregación/sedimentación de la fracción arcilla en presencia de NaCl y CaCl₂, y/o AH, se monitoreó utilizando dos espectrofotómetros UV-visible (Metrolab 1600 plus y Perkin Elmer Lambda35), midiendo la absorbancia de la suspensión en función del tiempo a 700 nm. La absorbancia se midió cada 3 min durante 1 h. Una primera serie de experimentos se realizó para determinar la influencia de la concentración de sólido y el pH de la suspensión en esta cinética. Para determinar la influencia de la concentración, se monitoreó la evolución de la absorbancia en suspensiones de 200, 400 y 600 mg L⁻¹, en NaCl 0,4 M a pH 7. El efecto del pH se determinó a partir de la evolución de la absorbancia de una suspensión de fracción arcilla 600 mg L⁻¹ a pH 5, 6 y 7. En todos los casos se usó una cubeta de vidrio de 1 cm de paso óptico.

En una segunda serie de experimentos se evaluó el efecto del NaCl y CaCl₂ en el proceso de agregación/sedimentación. Para ello se midió la evolución de la absorbancia de suspensiones de fracción arcilla de 600 mg L⁻¹,

en presencia de concentraciones variables de sodio (0,1 a 1 M) y calcio (2 a 24 mM). El pH de las suspensiones se ajustó a 7 con soluciones de NaOH y HCl.

Finalmente, para investigar la influencia del AH en el proceso de agregación/sedimentación de la fracción arcilla en presencia de CaCl₂, se prepararon suspensiones de fracción arcilla de 600 mg L⁻¹, AH 50 mg L⁻¹ y concentraciones variables de calcio (2 a 18 mM), a pH 7.

6.3.3. Evaluación del tamaño de partículas por dispersión de luz dinámica.

En unos pocos experimentos, el tamaño de las partículas se midió también en función del tiempo vía dispersión de luz dinámica, utilizando un equipo Zetasizer Nano ZS90 (Malvern). Después de la preparación de la suspensión una alícuota fue colocada inmediatamente en la cubeta de medición y ubicada en la cámara del equipo. La distribución por número de partículas se utilizó para monitorear el diámetro de las partículas cada 5 min durante 1 h.

Se realizaron tres tipos de experimentos: 1. Influencia del AH en la agregación de la fracción arcilla, 2. Contribución del sodio a la agregación de fracción arcilla en presencia de AH, y 3. Contribución del calcio a la agregación de fracción arcilla en presencia de AH. Para determinar la influencia del AH en la agregación de fracción arcilla se preparó una suspensión de arcilla 25 mg L⁻¹; a partir de la suspensión stock de 1 g L⁻¹, se adicionó una cantidad conocida de solución stock de AH 1 g L⁻¹, a fin de obtener una concentración final de 10 mg L⁻¹ y el pH se reguló a 7 con NaOH o HCl previo a la determinación de tamaño. Para evaluar la contribución del sodio a la agregación, se preparó una suspensión de igual modo que la descrita para el experimento 1, pero adicionando también NaCl 0,5 M (régimen de agregación controlada por difusión). Finalmente, un tercer experimento se realizó para evaluar la influencia de CaCl₂ 10 mM, para lo cual el procedimiento fue similar al mencionado previamente.

6.4. Resultados y Discusión

La Figura 6.1 muestra las curvas de calibración Absorbancia vs. concentración de fracción arcilla, desde 0 a 600 mg L⁻¹, obtenidas con los dos

espectrofotómetros utilizados para el estudio. Se obtuvieron dos curvas de calibración con $R^2 = 0,99$, apropiadas para la cuantificación de la fracción arcilla en los estudios de agregación/sedimentación.

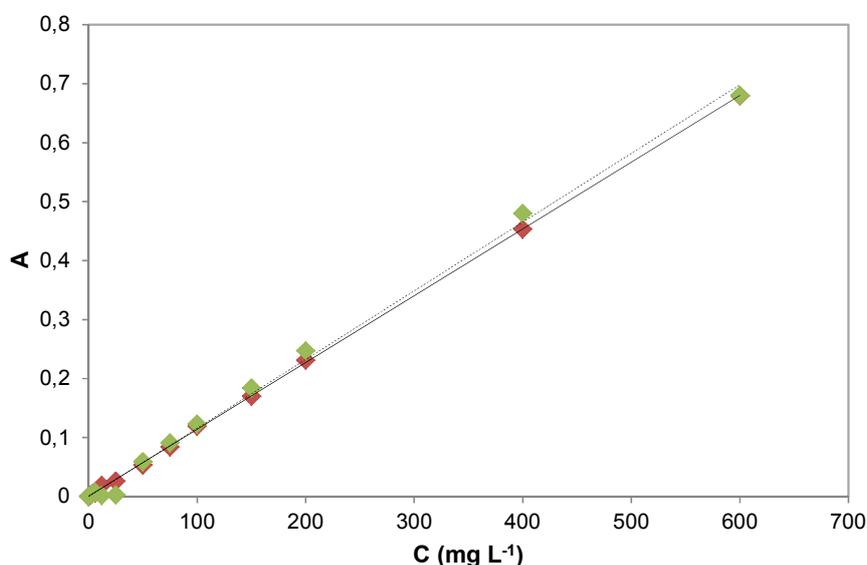


Figura 6.1. Curvas de calibración Absorbancia vs. concentración de fracción arcilla obtenidas con un espectrofotómetro Metrolab 1600 (♦) y Perkin Elmer Lambda35 (◆).

La Figura 6.2 muestra las curvas de sedimentación de una suspensión de fracción arcilla 400 mg L^{-1} en $\text{NaCl } 0,4 \text{ M}$, representando la evolución de la absorbancia vs. tiempo (6.2a) y la evolución de la absorbancia normalizada a tiempo cero (A/A_0) vs. tiempo (6.2b). Gráficos como el indicado en la Figura 6.2b fueron utilizados para el estudio del comportamiento de agregación/sedimentación de la fracción arcilla bajo diferentes condiciones experimentales. En la figura se observan al menos dos pendientes diferentes: una pendiente pequeña hasta los 30 min aproximadamente y una pendiente mayor luego de los 30 min. Phenrat et al. (7), en un estudio combinado de cinética de agregación seguido espectrofotométricamente y mediciones de tamaño de partículas y agregados por dispersión de luz encuentran un comportamiento similar para nanopartículas de hierro metálico en medios acuosos. La parte de la curva con pendiente pequeña fue debida al proceso de agregación, mientras que a tiempos más largos (la región de la curva con mayor pendiente) fue debida principalmente al proceso de sedimentación de los agregados formados en la etapa previa. En ciertos casos experimentales, estos autores encontraron a tiempos aún mayores una nueva pendiente

pequeña que fue atribuida a una sedimentación lenta de agregados. En concordancia con los resultados obtenidos por Phenrat et al. (7), en nuestro caso, la Figura 6.2 muestra una pendiente inicial pequeña, que se atribuye a agregación, y una región con pendiente más grande, que se atribuye a la rápida sedimentación de grandes agregados. Sólo la parte inicial de la región con pendiente más pequeña (indicada como agregación en la Figura 6.2) será utilizada para los cálculos de $1/W$.

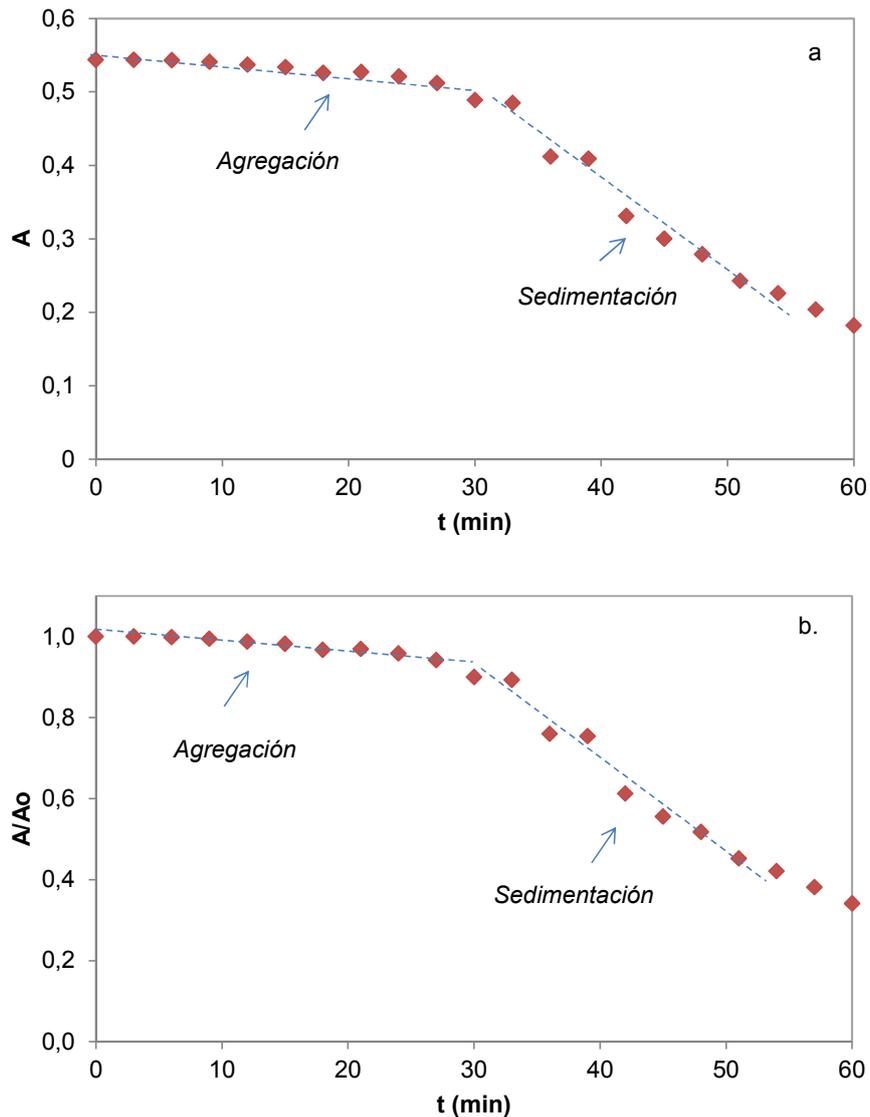


Figura 6.2. a) Absorbancia vs. tiempo de una suspensión de fracción arcilla 400 mg L^{-1} en NaCl $0,4 \text{ M}$ a pH 7, b) absorbancia normalizada de fracción arcilla (A/A_0) vs. tiempo para las condiciones experimentales indicadas en a). Las dos rectas que se dibujan representan las pendientes que corresponden a la fase de agregación y a la de sedimentación. El punto de cruce de las curvas, alrededor de 30 min, puede tomarse como el tiempo necesario para que los agregados que se forman sean lo suficientemente grandes como para comenzar a sedimentar.

La Figura 6.3 muestra curvas A/A_0 vs. tiempo para experimentos realizados con diferentes concentraciones de arcilla y a diferentes pH. En la Figura 6.3a se muestra la evolución de A/A_0 vs. tiempo para tres concentraciones iniciales de fracción arcilla, 200, 400 y 600 mg L⁻¹ a pH 6. Para la concentración de 200 mg L⁻¹ casi todos los puntos experimentales corresponden al proceso de agregación; sólo a tiempos mayores que 50 min se observa un leve cambio en la pendiente que posiblemente sea debido a sedimentación. Para 400 y 600 mg L⁻¹ de fracción arcilla tanto la etapa de agregación como la de sedimentación son bien evidentes. Una comparación de las tres curvas indica que las pendientes en las zonas de agregación y sedimentación aumentan a medida que aumenta la concentración de arcilla, y que el tiempo necesario para que comience la sedimentación disminuye a medida que aumenta esa concentración.

La Figura 6.3b muestra las curvas de A/A_0 vs. tiempo para tres valores de pH diferentes: 5, 6 y 7, a una concentración de 600 mg L⁻¹. Para el estudio a pH 7 se observa un comportamiento en dos etapas, primero una etapa de agregación de partículas de ~ 35 min, y luego de este tiempo una etapa de sedimentación de agregados. Para pH 5 se visualizan tres etapas, primero una etapa de agregación que transcurre durante aproximadamente 20 min de reacción. En segundo lugar hay una etapa de sedimentación rápida de grandes agregados durante los siguientes 20 min. Por último hay una tercera etapa de sedimentación lenta que probablemente está asociada a la sedimentación de agregados más pequeños. El experimento a pH 6 presenta una situación intermedia entre las de pH 5 y 7. El comportamiento de agregación/sedimentación de dos o tres etapas coincide con los resultados obtenidos por Phenrat et al (7) en el estudio de partículas de hierro, y con los obtenidos por Keller et al (6) para la sedimentación de nanopartículas de óxidos metálicos en matrices acuosas.

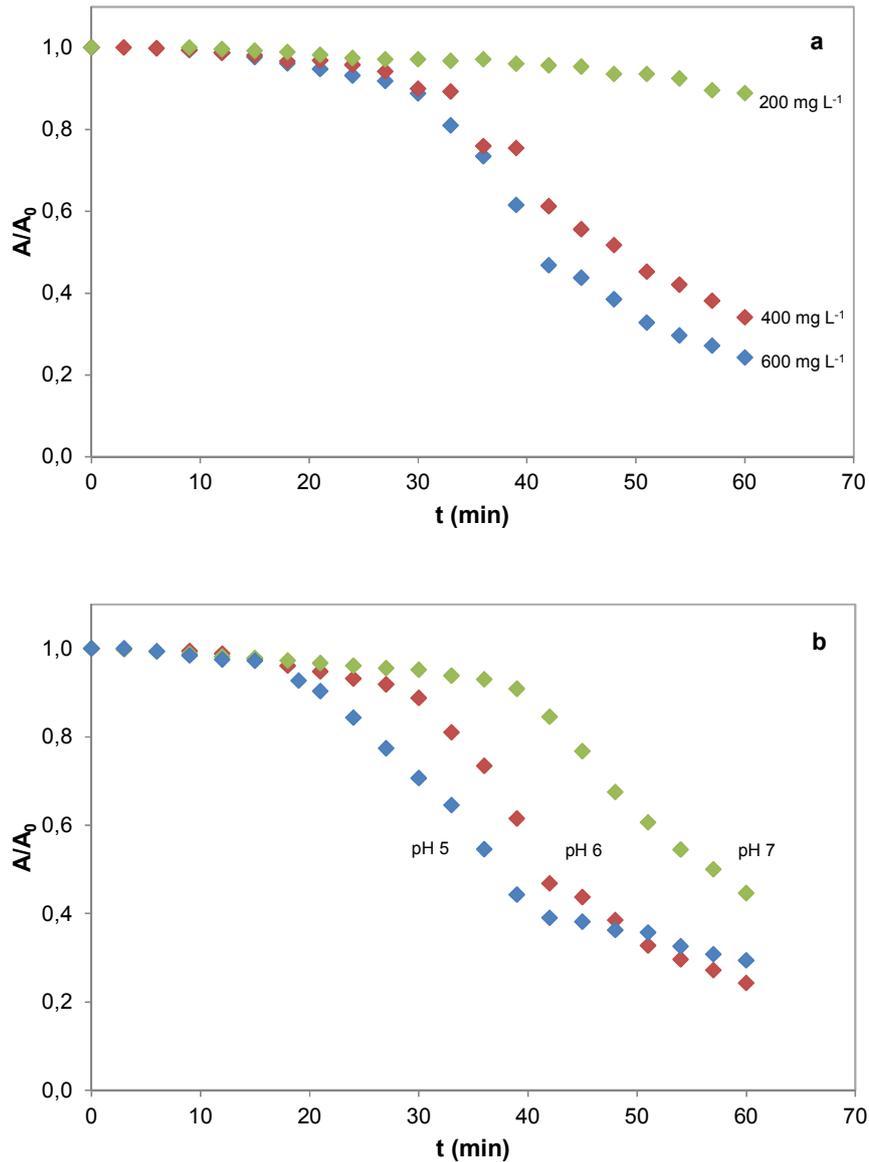


Figura 6.3. a) Influencia de la concentración de partículas e b) Influencia del pH, en las curvas de agregación/sedimentación de la fracción arcilla.

En la Figura 6.4 se indican las curvas de agregación/sedimentación de suspensiones de arcilla 600 mg L^{-1} a pH 7 bajo diferentes condiciones experimentales. En la Figura 6.4a se muestra el efecto de la concentración de NaCl, desde 0,1 a 1,0 M. Para concentraciones bajas, $< 0,17 \text{ M}$, las curvas consisten de una única región donde las partículas no llegan a formar agregados de tamaño crítico; sólo se observa la etapa de agregación. Mientras que para concentración de NaCl más alta, $\geq 0,20 \text{ M}$, se observan las dos fases mencionadas previamente al describir la Figura 6.3, primero las partículas se

agregan durante un tiempo de ~ 30 min, y luego en una segunda etapa los agregados son tan grandes que sedimentan.

La Figura 6.4b muestra el efecto de la concentración de CaCl_2 , desde 2 a 24 mM, sobre las curvas de agregación/sedimentación de la suspensión. A concentraciones bajas de calcio, < 3 mM, las curvas están formadas por una única etapa, mientras que a concentraciones más altas, desde 4 a 24 mM, se encuentran las dos etapas. Es evidente que el calcio es más efectivo que el sodio en producir la agregación. En capítulos anteriores se mostró que el potencial zeta de las partículas de la fracción arcilla se hace menos negativo en presencia de iones calcio. Esta reducción en el potencial zeta seguramente resulta en una disminución en las interacciones repulsivas entre las partículas, favoreciendo la agregación.

La Figura 6.4c muestra el efecto de la concentración de CaCl_2 sobre las curvas de agregación/sedimentación de la suspensión de arcilla con 50 mg L^{-1} de AH. Se observa que la velocidad de agregación aumenta con el aumento de la concentración de calcio, al igual que en la Figura 6.4b. Sin embargo, a diferencia de las Figuras 6.4a y 6.4b, en presencia de AH todas las curvas presentan tres etapas, una primera etapa donde ocurre la agregación de partículas, una segunda etapa donde ocurre la sedimentación y una tercer etapa de sedimentación más lenta. Además se observa también que el período en el cual ocurre la agregación es más corto en presencia de AH, y luego de ~ 20 min los agregados de partículas comienzan a sedimentar. Estos resultados de agregación acelerada de partículas en presencia de iones calcio fueron reportados por Chen y Elimelech (23) en un estudio de agregación de nanopartículas de C_{60} con AH y en otro estudio de Chen et al (32) de agregación de hematita cubierta con alginato. Además, los resultados de tres etapas coinciden con los obtenidos por Phenrat et al (7).

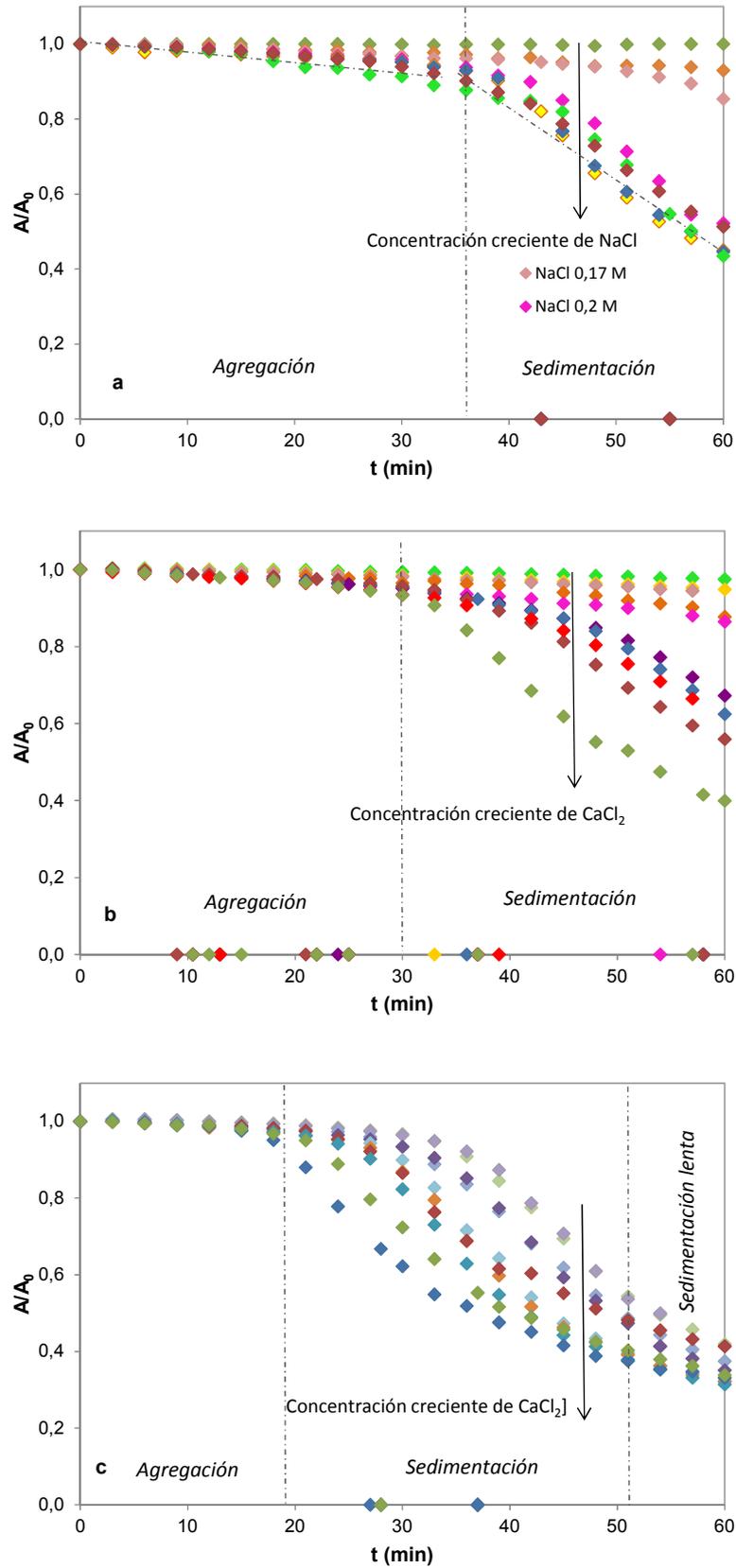


Figura 6.4. Curvas de agregación/sedimentación de la fracción arcilla en diferentes electrolitos a pH 7: a) NaCl 0,1 a 1,0 M; b) CaCl₂ 2 a 24 mM y c) CaCl₂ 2,5 a 12 mM en presencia de AH 50 mg L⁻¹.

Los valores de $1/W$ fueron calculados usando los dos métodos mencionados en la sección 6.2. Teoría. En el primer caso, a partir de la pendiente inicial de curvas C vs t , que tienen la misma forma que las curvas de la Figura 6.4, se calculó el producto $\alpha k C_0^2$ (Ecuación 6.6) para cada una de las diferentes concentraciones de NaCl o CaCl₂. En el segundo caso, usando las absorbancias a diferentes tiempos se calcularon los valores de turbidez (Ecuación 6.4), luego se calcularon los valores de radio (Ecuación 6.9) usando $\phi=2,98 \times 10^{-4}$ y $Q=2$, y por último se construyeron curvas a vs. t . De la pendiente inicial de estas curvas se calculó el producto $\beta k n_0$ (Ecuación 6.10) para cada una de las diferentes concentraciones de NaCl o CaCl₂. Los resultados se muestran en las Tablas 6.1 y 6.2.

Tabla 6.1. Parámetros cinéticos de agregación de la fracción arcilla en NaCl.

NaCl (M)	Fracción arcilla			
	$\alpha k C^2$ $\times 10^{-4}$	$1/W$	$\beta k n_0$ $\times 10^{-3}$	$1/W$
0,10	0,25	0,03	0,10	0,03
0,115	0,59	0,06	0,17	0,04
0,12	2,30	0,13	0,64	0,16
0,15	8,37	0,44	2,55	0,60
0,17	11,30	0,63	3,22	0,73
0,20	14,70	0,81	3,94	0,94
0,40	16,90	1,00	4,27	0,96
0,80	17,40	1,00	4,53	1,00
1,00	17,40	0,94	4,05	0,94

Tabla 6.2. Parámetros cinéticos de agregación de la fracción arcilla en CaCl₂ con y sin agregado de AH (50 mg L⁻¹).

CaCl ₂ (mM)	Fracción arcilla				Fracción arcilla más AH			
	akC^2 x 10 ⁻⁴	$1/W$	βkn_0 x 10 ⁻³	$1/W$	akC^2 x 10 ⁻⁴	$1/W$	βkn_0 x 10 ⁻³	$1/W$
2,0	2,90	0,18	0,68	0,16	-	-	-	-
2,5	5,49	0,30	1,13	0,25	4,40	0,24	0,59	0,16
2,8	6,63	0,42	1,63	0,37	5,73	0,36	0,82	0,22
3,0	11,0	0,66	3,11	0,65	9,86	0,60	1,89	0,53
4,0	16,50	0,95	4,38	0,94	12,30	0,71	2,38	0,64
4,5	-	-	-	-	15,50	0,89	2,89	0,74
5,0	16,30	0,95	3,93	0,83	16,70	1,01	3,34	0,88
8,0	-	-	-	-	15,70	0,95	-	-
12,0	15,70	0,95	-	-	15,70	0,95	3,76	1,00
18,0	18,50	1,07	4,96	1,06	-	-	-	-
24,0	18,20	1,07	4,68	1,00	-	-	-	-

La Figura 6.5 representa la eficiencia de unión ($1/W$) de las partículas de fracción arcilla en función de la concentración de NaCl y en función de la concentración de CaCl₂ en presencia y ausencia de AH. La Figura 6.5 para sodio revela dos comportamientos típicos de sistemas coloidales en los cuales la cinética de agregación puede ser explicada por la teoría DLVO (23). A bajas concentraciones de sodio, $1/W$ aumenta con el aumento de la concentración de sodio debido a la compactación de la doble capa eléctrica, lo cual reduce la barrera energética repulsiva para la agregación. Este comportamiento ocurre en el régimen limitado por reacción y es la etapa más lenta del proceso. A concentraciones suficientemente altas de sodio, la barrera electrostática repulsiva es mínima y se alcanza el límite difusional para la agregación, por lo que $1/W$ adquiere valores cercanos a la unidad. La intersección de las líneas en la Figura 6.5 indica la concentración crítica de coagulación (CCC), que para el caso del NaCl es de 0,22 M. Este valor está en el rango de CCC obtenido para agregación de minerales arcillosos en suspensión, tal como fue reportado por García-García et al. (26) para montmorillonita.

La eficiencia de unión de las partículas de fracción arcilla es también presentada en función de la concentración de CaCl₂ en ausencia y presencia

de 50 mg L⁻¹ AH. Al igual que para el caso de NaCl, se observan dos regímenes, uno limitado por reacción, a concentraciones más bajas de calcio y otro limitado por difusión, a las concentraciones más altas, por lo que el comportamiento de agregación es también tipo DLVO. Extrapolando entre los dos regímenes se obtiene un valor de CCC de ~ 4,0 mM tanto en ausencia como en presencia de AH. En presencia de AH se observa una curva de estabilidad bastante similar a la obtenida en ausencia de AH, una pequeña variación observada en la CCC puede asociarse a error experimental, más que a un efecto del AH.

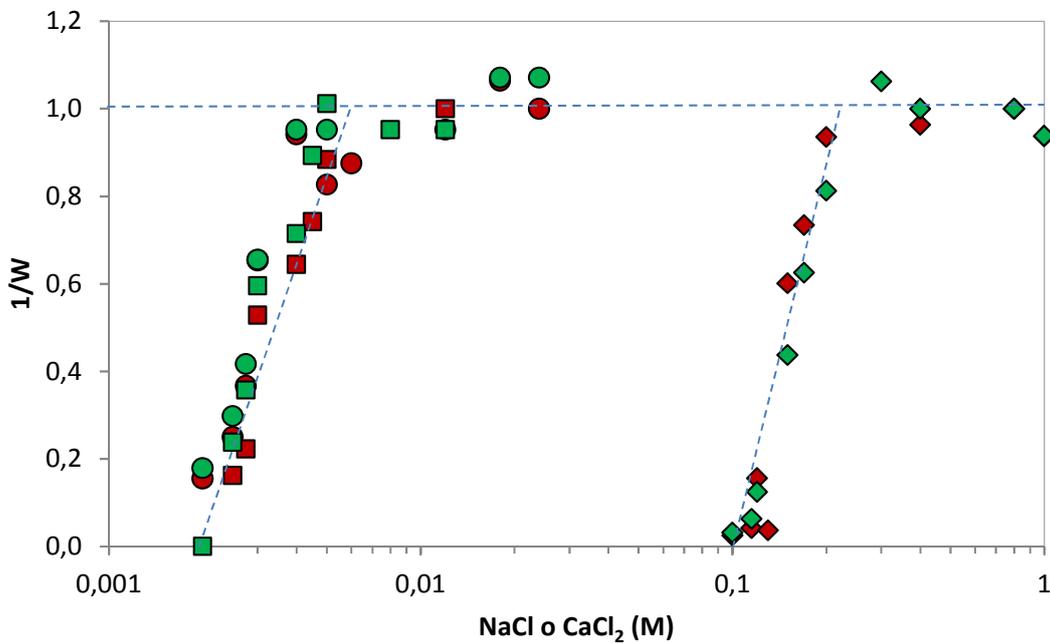


Figura 6.5. Curvas de estabilidad de partículas de fracción arcilla a pH 7, en NaCl (◇) y en CaCl₂ en ausencia (○) y en presencia (□) de AH. Los símbolos de color verde representan los cálculos a partir de la Ecuación 7 y los de color rojo los cálculos a partir de la Ecuación 11. La CCC es de 0,22 M para NaCl. La CCC en CaCl₂ es de alrededor de 4,0 mM. No se observa efecto considerable del agregado de AH en la CCC para CaCl₂.

La Figura 6.6 muestra los resultados obtenidos por dispersión de luz dinámica para la evolución de la distribución de tamaño de partículas de fracción arcilla en suspensión (25 mg L⁻¹) en función del tiempo para tres experimentos: a) en presencia de 10 mg L⁻¹ de AH, b) en presencia de 10 mg L⁻¹ de AH y NaCl 0,5 M y c) en presencia de 10 mg L⁻¹ de AH y CaCl₂ 10 mM. Nótese que la concentración de arcilla (25 mg L⁻¹) es mucho menor en estos

casos que en los estudios de turbidez mostrados anteriormente (600 mg L^{-1} en la mayoría de los casos).

Las Figuras 6.6a y 6.6b muestran una distribución monomodal del tamaño de partículas de fracción arcilla en presencia de AH y en presencia de AH más NaCl. El diámetro medio de las partículas es de $\sim 530 \text{ nm}$ y $\sim 720 \text{ nm}$ respectivamente y no se modifica o se modifica muy poco durante el intervalo de tiempo estudiado. El diámetro ligeramente superior de las partículas en presencia de sodio está asociado probablemente a que las altas fuerzas iónicas cuando hay NaCl producen una compactación de la doble capa eléctrica favoreciendo la agregación de las partículas.

La Figura 6.6c muestra dos tipos de distribuciones de tamaño de partículas de fracción arcilla en presencia de AH más CaCl_2 : una distribución monomodal para los primeros 5 y 10 min de reacción, donde el tamaño de partículas aumenta desde ~ 1100 a $\sim 1480 \text{ nm}$, lo cual podría asociarse a la formación de agregados de partículas de fracción arcilla, moléculas de AH y calcio. A los 20 min de reacción se observa un aumento del ancho de la distribución y pueden visualizarse dos picos poco definidos, los cuales se redefinen a los 30 min de reacción, donde la distribución de partículas es claramente bimodal. En este último caso se observan dos picos bien definidos, uno a $\sim 400 \text{ nm}$ y otro a $\sim 1480 \text{ nm}$. La aparición de estos dos picos indica que el proceso de agregación es un proceso complejo y no se conoce a ciencia cierta a qué se debe este comportamiento. Es posible suponer que el pico a $\sim 400 \text{ nm}$ es debido a agregados de AH inducidos por la presencia de iones calcio y que el pico a $\sim 1480 \text{ nm}$ es debido a agregados de arcilla y AH con iones calcio como sustancia cementante. En el primer caso, estudios cinéticos de agregación de AH en presencia de iones calcio indicaron que el tamaño de los agregados formados oscila entre 91 y 700 nm luego de 30 min de reacción. En el segundo caso, los resultados coinciden con los obtenidos por Séquaris (24) en el estudio de coloides de suelo. Sin embargo, sería necesario realizar más estudios para corroborar esta hipótesis.

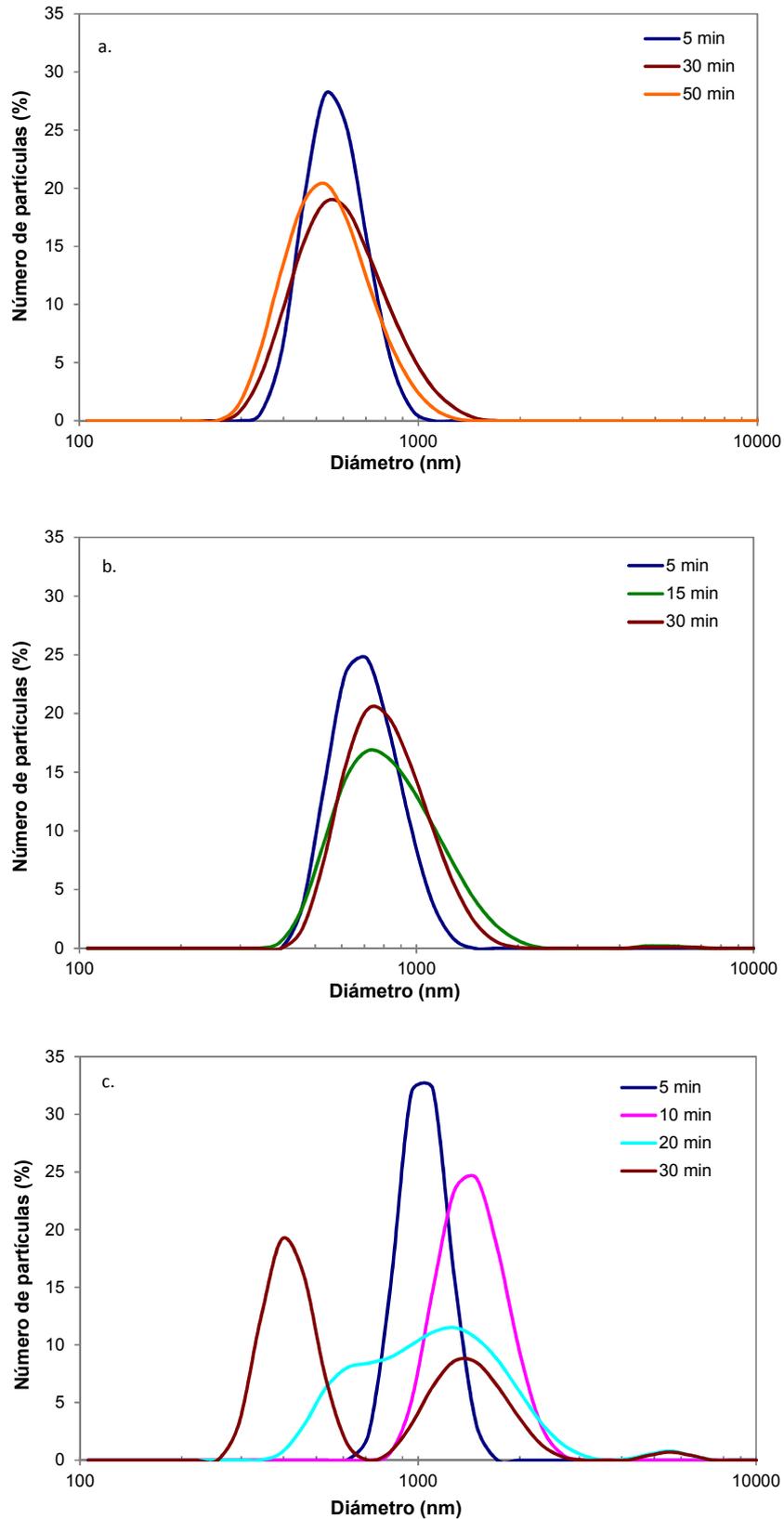


Figura 6.6. Distribución de tamaño de las partículas de fracción arcilla en suspensión (25 mg L^{-1}) en función del tiempo en un experimento cinético de agregación/sedimentación: a) en presencia de AH 10 mg L^{-1} , b) en presencia de AH 10 mg L^{-1} y NaCl $0,5 \text{ M}$ y c) en presencia de AH 10 mg L^{-1} y CaCl_2 10 mM .

6.5. Conclusiones

El estudio de la cinética de agregación / sedimentación de la fracción arcilla del suelo en presencia de AH y cationes sodio y calcio mediante mediciones de turbidez, indicó un comportamiento de una, dos o tres etapas. Una primera etapa de agregación que coincide con una pequeña disminución de la turbidez de la suspensión, una segunda etapa de sedimentación rápida donde se observa mayor disminución de turbidez y en algunos casos una tercera etapa de sedimentación lenta. Las medidas de turbidez mediante espectroscopia visible resultaron aptas para los estudios realizados y fácilmente ejecutables en cualquier laboratorio que posee este tipo de equipamiento básico.

Se utilizó la primera etapa para calcular la velocidad de agregación y la eficiencia de unión. La velocidad de agregación se estimó de dos maneras diferentes: empleando relaciones de concentración vs. tiempo y empleando relaciones de radio vs. tiempo. Las curvas de estabilidad graficadas a partir de ambos datos de velocidad arrojan resultados similares, lo cual indica que los dos métodos de cálculo propuestos son aptos para el estudio realizado. A partir de las curvas de estabilidad de la fracción arcilla se obtuvo la CCC para NaCl (0,22 M) y para CaCl₂ (4,0 mM). No se observó efecto considerable del agregado de AH en la CCC para CaCl₂.

Los estudios de evolución de tamaño de la fracción arcilla por dispersión de luz, indicaron una distribución monomodal en presencia de NaCl, mientras que hubo una distribución bimodal ante la presencia de CaCl₂ luego de 30 min de reacción. La aparición de estos dos picos en presencia de iones calcio indica que el proceso de agregación es un proceso complejo y no se conoce a ciencia cierta a qué se debe este comportamiento. Estudios como este requieren mayor profundización para corroborar el efecto de diferentes iones en el tamaño de los agregados de la fracción arcilla del suelo.

6.6. Bibliografía

1. Kretzschmar R, Hotlhoff H, Sticher H. 1998. Influence of pH and humic acid on coagulation kinetics of kaolinite: a dynamic light scattering study. *Journal of Colloid and Interface Science*. 202:95-103.
2. Buschiazzo DE, Aimar SB, Stahr K. 1995. Factores que afectan la estabilidad estructural de suelos de la Región Semiárida Pampeana Central (Argentina). *Ciencia del Suelo*. 13:66-69.
3. Akbour RA, Douch J, Hamdani M, Schmitz P. 2002. Transport of Kaolinite Colloids through Quartz Sand: Influence of Humic Acid, Ca²⁺, and Trace Metals. *Journal of Colloid and Interface Science*. 253:1-8.
4. Heil D & Sposito G. 1993. Organic matter role in illitic soil colloids dlocculation: I. Counter ions and pH. *Soil. Sci. Soc. Am. J.* 57:1241-1246.
5. Heil D & Sposito G. 1993. Organic matter role in illitic soil colloids flocculation: II. surface charge. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 57:1246-1253.
6. Keller AA, Wang H, Zhou D, Lenihan HS, Cherr G, Cardinale BJ, Miller R, Ji Z. 2010. Stability and aggregation of metal oxide nanoparticles in natural aqueous matrices. *Environ. Sci. Technol.* 44:1962-1967.
7. Phenrat T, Saleh N, Sirk K, Tilton RD, Lowry GV. 2007. Aggregation and sedimentation of aqueous nanoscale zerovalent iron dispersions. *Environ. Sci. Technol.* 41:284-290.
8. Deonarine A, Lau BLT, Aiken GR, Ryan JN, Hsu-Kim H. 2011. Effects of humic substances on precipitation and aggregation of zinc sulfide nanoparticles. *Environ. Sci. Technol.* 45:3217-3223.
9. Tombácz E. 2003. Effects of environmental relevant organic complexants on the surface charge and the interaction of clay mineral and metal oxide particles. En: *Role of interfaces in environmental protection*. Ed. Barany S. Kluwer academic publishers. Netherlands. pp 397-494.
10. Tombácz E, Libor Z, Illés E, Majzik A, Klumpp E. 2004. The role of reactive surface sites and complexation by humic acids in the interaction of clay mineral and iron oxide particles. *Organic Geochemistry*. 35:257-267.
11. Nguyen MN, Dultz S, Tran TTT, Bui ATK. 2013. Effect of anions on dispersion of a kaolinitic soil clay: a combined study of dynamic light scattering and test tube experiments. *Geoderma*. 209-210:209-213.
12. Liu X, Wazne M, Chou T, Xiao R, Xu S. 2011. Influence of Ca²⁺ and Suwannee river humic acid on aggregation of silicon nanoparticles in aqueous media. *Water Research*. 45:105-112.
13. Swift RS. 1999. Macromolecular properties of soil humic substances. Fact, fiction, and opinion. *Soil Sci.* 164:790–802.

14. Conte P & Piccolo A. 1999. Conformational arrangement of dissolved humic substances Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.* 33:1682–1690.
15. Wershaw RL & Aiken GR. 1985. Chapter 15. Molecular size and weight measurements of humic substances. En: *Humic substances in soil, sediment and water*. Ed. Aiken GR, Mcknight DM, Wershaw RL, Maccarthy P. John Wiley & Sons. Estados Unidos. pp 477-492.
16. Sutton R & Sposito G. 2005. Molecular structure in soil humic substances: the new view. *Environ. Sci. Technol.* 39:9009–9015.
17. Kloster N, Brigante M, Zanini G, Avena M. 2013. Aggregation kinetics of humic acids in the presence of calcium ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 427:76-82.
18. Molina FV. 2014. *Soil Colloids properties and ion binding*. CRC Press. pp 545.
19. Majzik A & Tombacz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions I. Interfacial and aqueous phase equilibria: Adsorption and complexation. *Organic Geochemistry.* 38:1319–1329.
20. Majzik A & Tombacz E. 2007. Interaction between humic acid and montmorillonite in the presence of calcium ions II. Colloidal interactions: charge state, dispersing and/or aggregation of particles in suspension. *Organic Geochemistry.* 38:1330–1340.
21. Poluvesova T, Chen Y, Stefan C, Selle M, Werner P, Chefetz B. 2009. Sorption of polyaromatic compounds by organic matter-coated Ca²⁺- and Fe³⁺-montmorillonite. *Geoderma.* 154:36-41.
22. Maurice PA & Namjesnik Dejanovic K 1999. Aggregate structures of sorbed humic substances observed in aqueous solution. *Environ. Sci. Technol.* 33:1538-1541.
23. Chen KL & Elimelech M. 2007. Influence of humic acid on the aggregation kinetics of fullerene (C₆₀) nanoparticles in monovalent and divalent electrolyte solutions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 309:126-134.
24. Séquaris JM. 2010. Modeling the effects of Ca²⁺ and clay-associated organic carbon on the stability of colloids from topsoils. *Journal of Colloid and Interface Science.* 343:408-414.
25. Borgino L. 2013. Experimental determination of the colloidal stability of Fe (III)-montmorillonite: Effects of organic matter, ionic strength and pH conditions. *Colloids and surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 423:178-187.
26. García-García S, Wold S, Jonsson M. 2007. Kinetic determination of critical coagulation concentrations for sodium- and calcium-montmorillonite colloids in NaCl and CaCl₂ aqueous solutions. *Journal of Colloid and Interface Science.* 315:512-519.
27. Pitois A, Abrahamsen LG, Ivanov PI, Bryan ND. 2008. Humic acid sorption onto a quartz sand surface: a kinetic study and insight into fractionation. *Journal of Colloid and Interface Science.* 325:93-100.

28. Norde W. 2003. *Colloids and Interfaces in Life Sciences*. CRC Press. New York. pp 448.
29. Sposito G. 2004. *The Surface Chemistry of Natural Particles*. Oxford University Press. New York. pp. 256.
30. Elimelech M, Gregory J, Jia X, Williams RA. 1995. *Particle deposition and aggregation*. Butterworth-Heinemann. Estados Unidos. pp 441.
31. Melik DH & Floger HS. 1983. Turbidimetric determination of particle size distributions of colloidal systems. *Journal of Colloid and Interface Sciences*. 92:161–180.
32. Chen KL, Mylon SE, Elimelech M. 2006. Aggregation Kinetics of Alginate-Coated Hematite Nanoparticles in Monovalent and Divalent Electrolytes. *Environ. Sci. Technol.* 20:1516-1523.

Capítulo 7.

Conclusiones Finales

El objetivo de este trabajo de tesis fue estudiar la interacción de los AH con la solución del suelo y con la fracción arcilla del suelo. Es reconocido que la formación de complejos AH-arcilla, por asociación de los AH a la fracción mineral del suelo es un proceso con un impacto significativo sobre la conservación de materia orgánica y el secuestro de carbono. Además tienen el potencial de contribuir a la reducción de emisiones de gases con efecto invernadero por acumulación de materia orgánica en la fase sólida.

Para obtener información sobre la interacción de estos componentes en suelo, se abordó el estudio principalmente a partir de experimentos de adsorción y agregación de los componentes sólidos, AH y fracción arcilla del suelo, bajo diferentes condiciones de la solución. Se utilizaron estudios en condiciones de equilibrio, como así también evaluaciones cinéticas de los procesos de agregación y sedimentación.

Durante este trabajo de tesis:

- ✓ Se extrajo el AH y la fracción arcilla a partir de un mismo suelo de la Región Semiárida Pampeana Argentina. Ambas fracciones, orgánica y mineral, fueron caracterizadas empleando diversas metodologías (análisis de composición elemental por combustión seca, espectroscopia infrarroja, espectroscopia UV-visible, dispersión de luz dinámica, microscopía electrónica de barrido y microscopía óptica, espectroscopia por fluorescencia de rayos X, difracción de rayos X). La información obtenida fue la base para la interpretación de los resultados en los estudios de adsorción y agregación. Se destaca que los resultados de esta tesis contribuyen a los pocos que existen en bibliografía, utilizando los componentes originales de un mismo suelo.
- ✓ Se estudió la cinética de agregación de AH en el rango de pH de 5 a 9 en presencia de concentraciones variables de calcio. Se observó que la velocidad de agregación del AH aumenta significativamente con el aumento de la concentración de calcio. Se propuso un mecanismo de reacción, donde la unión de iones calcio ocurre rápidamente, seguida por una formación lenta de núcleos o pequeños agregados de moléculas $AHCa_x$. También ocurre una agregación posterior que lleva a la formación de agregados grandes que pueden ser observados con un microscopio óptico.

- ✓ A partir de los datos cinéticos se halló la CCC de calcio para el AH ($1,0 \pm 0,2$ mM). Se destaca que la presencia de iones calcio es fundamental para mantener la estabilidad de los agregados de AH. Estos resultados son importantes para los sistemas medioambientales, dado que la dinámica del proceso de agregación-desagregación de AH juega un rol importante en el transporte y protección de contaminantes en el medioambiente, como así también en la estabilización de la materia orgánica del suelo.
- ✓ Se corrobora que el calcio juega un rol clave en la interacción de los AH con la fracción mineral en suelos, aguas y sedimentos, ya que es capaz de enlazar tanto sitios superficiales de la superficie de los minerales como grupos funcionales en las moléculas del AH, disminuyendo el potencial zeta negativo en ambos casos y favoreciendo la interacción. Bajas concentraciones de calcio favorecen la adsorción de AH, mientras que altas concentraciones de calcio inducen la agregación superficial de AH, la cual lleva a una remoción importante del AH disuelto.
- ✓ Se utilizaron curvas del tipo Γ_{AH} vs. CCa , y gráficos Γ_{Ca} vs. CCa para detectar la agregación superficial del AH. Este tipo de curvas fueron empleadas por primera vez para este tipo de estudios. Los resultados obtenidos son potencialmente útiles para el entendimiento de la retención de materia orgánica por las partículas de suelo.
- ✓ La cinética de agregación / sedimentación de la fracción arcilla del suelo en presencia de AH y cationes sodio y calcio, se estudió mediante mediciones de turbidez. Se utilizaron dos métodos para estimar la velocidad de agregación y las relaciones de estabilidad: relaciones de concentración vs. tiempo y relaciones de radio vs. tiempo. Las curvas de estabilidad graficadas a partir de ambos datos de velocidad arrojan resultados similares, lo cual indica que los dos métodos de cálculo propuestos son aptos para el estudio realizado.
- ✓ Se calculó la CCC de la fracción arcilla para NaCl (0,22 M) y para CaCl₂ (4,0 mM). No se observó efecto considerable del agregado de AH en la CCC para CaCl₂.