ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

Sociedad Colombiana
de la Ciencia del Suelo

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE ÁCIDOS HÚMICOS PROVENIENTES DE SUELOS ALTOANDINOS CON DIFERENTE USO

ClaudiaMartínez[1]✉; Isabel Bravo[2]; Francisco Martín[3]

[1]Universidad del Cauca
Grupo de Agroquímica,
departamento de Química

✉
cxmartinez@unicauca.edu.co

[2]Universidad del Cauca
Grupo de Agroquímica,
departamento de Química

✉ ibravo@unicauca.edu.co

[3]Departamento de Edafología y Química agrícola,
Universidad de Granada,
España

✉ fjmartin@ugr.es)

Palabras clave: Ácidos húmicos; CPMAS ^{13}CRMN; IRTF; análisis elemental

RESUMEN

Los Ácidos Húmicos (AH), macromoléculas componentes de la materia orgánica del suelo, cumplen funciones importantes, resaltándose la retención de contaminantes y la captura de carbono en forma estable. La composición química de AH provenientes de ecosistemas Altoandinos (subcuenca río Las Piedras), departamento del Cauca, de tres usos bosque, pastura y cultivo fue determinada mediante resonancia magnética nuclear de estado sólido (CPMAS^{13}CRMN) en combinación con espectroscopia infrarroja (IRTF) y análisis elemental. Los AH se obtuvieron mediante extracción secuencial con soluciones de tetraborato, pirofosfato e hidróxido de sodio (0,1N), y fueron debidamente purificados. El análisis de CPMAS ^{13}CRMN indica la distribución química del carbono en zonas de desplazamiento de 0~50 ppm: 32.2%, 49.5% y 59.2%; 50~110ppm: 29.1%, 30.0 % y 26.7%; 110~160ppm: 20.1%, 10.46% y 6.61%; 160-220 ppm: 18.6%, 10.2 % y 8.4 % en cultivo, bosque y pastura respectivamente. La relación C/H es 0.88, 0.67 y 0.65 en cultivo, bosque y pastura, lo cual coincide con la aromaticidad determinada mediante CPMAS^{13}CRMN. En IRTF se observa bandas similares pero con diferente intensidad, revelando alto contenido de componentes alifáticos, deducible de la intensidad de absorción a 2919–2849 cm^{-1} y presencia de la banda a 1450cm^{-1}, características de estiramiento CH_2 y vibraciones en cadenas alquílicas largas. Se observan diferencias en la composición química de AH, revelando influencia de las condiciones ambientales en ella, resaltando mayor grado de condensación en AH de cultivo.

CHEMICAL COMPOSITION OF THE HUMIC ACIDS FROM HIGH ANDEAN SOILS WITH DIFFERENT USE

Key words: humic acids; CPMAS ^{13}CNMR; FTIR; elemental analysis.

SUELOS ECUATORIALES
43 (2): 61-66

ISSN 0562-5351

ABSTRACT

The humic acids (HA) are macromolecules which are components of the organic matter of soils. They carry out an important role by standing out the retention of contaminant substances and the capture of carbon in stable form. The chemical composition of HA coming from high Andean ecosystems having three kinds of use: forest, pasture and crop (subbasin of Rio Las Piedras in the department of Cauca), was determined by nuclear magnetic resonance of solid state (CPMAS^{13}CNMR) in combination with infrared spectroscopy (FTIR) and elemental analysis. The HA were obtained by sequential extraction with tetraborate, pyrophosphate and sodium hydroxide solutions (0,1N) and were properly purified. The analysis of CPMAS ^{13}CNMR shows the chemical distribution of carbon in areas of displacement of 0 ~ 50 ppm: 32.2%, 49.5% and 59.2%, 50 ~ 110 ppm: 29.1%, 30.0% and 26.7%, 110 ~ 160 ppm: 20.1 %, 10.46% and 6.61%, 160-220 ppm: 18.6%, 10.2% and 8.4% in crop, forest and pasture respectively. The C/H ratio is 0.88, 0.67 and 0.65 in crop, forest and pasture which coincide with the aromaticity determined through CPMAS ^{13}CNMR. Similar bands were observed in FTIR but with different intensity, revealing high content of aliphatic components, deducible from the intensity of absorption at 2919 2849 cm^{-1}and the presence of the band at 1450cm^{-1}, stretching characteristics CH_2 and long alkyl chains. There are differences in the chemical composition of HA, revealing the influence of environmental conditions on it, standing out a higher grade of condensation in HA from crop.

INTRODUCCIÓN

Las sustancias húmicas (SH) son los principales constituyentes de la materia orgánica presente en suelos, formadas por la degradación química y enzimática de los residuos de plantas y animales y por la actividad sintética de microorganismos (López *et al*., 2003; Naafs 2004). En los suelos las SH se producen bajo diferentes condiciones de vegetación, temperatura y actividad biológica, por lo que pueden esperarse diferencias en cada uno de sus componentes, ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas, según su origen (IPCC. 2000, Van der kamp *et al*., 2009; Rodríguez *et al*., 2004).

Los suelos en los ecosistemas Altoandinos son generalmente derivados de cenizas volcánicas, pertenecen a los andisoles, y se caracterizan por altos contenido de materia orgánica, la cual regula sus propiedades físicas, químicas y biológicas, entre las que se destacan: baja densidad aparente, alta porosidad, capacidad de infiltración, retención de humedad y conductividad hidráulica. La materia orgánica suministra alta capacidad de intercambio catiónico e interviene en retención de contaminantes orgánicos e inorgánicos y formación de complejos con metales (Tobón 2009). Sus principales beneficios, se atribuyen especialmente a la fracción más estable, representada por los AH, que contribuyen a mayor captura de carbono en el suelo, atribuida a una gama amplia de estructuras aromáticas condensadas envueltas por componentes de cadenas alifáticas, de alto peso molecular. El tiempo de residencia de los AH en el suelo es alrededor de 1,5 veces la de los ácidos fúlvicos (AF) como lo reporta Piccolo (1996).

Una de las microcuencas de la Subcuenca Río Las Piedras está ubicada en el municipio de Totoró, departamento del Cauca, sobre la cuenca del río Cauca. Esta subcuenca comprende, Selva Andina y Páramo. Predominan las formas de montaña, presentándose un proceso de erosión natural, propiciado geológicamente por las formas escarpadas del relieve. Sin embargo, en esta zona se está expandiendo la frontera agrícola y de pastoreo debido al incremento de la explosión demográfica y a la falta de fertilidad de sus suelos. El desarrollo de la agricultura en estas tierras en forma inadecuada implicaría pérdida de materia orgánica, un efecto similar produce el cambio climático global (CRC 2006). Por ello es necesario conocer la materia orgánica de estos suelos, principalmente la de los AH, reservorio de C, menos vulnerable a corto y a largo plazo, impidiendo la producción de gases efecto invernadero, siendo deseable que predominen sobre los ácidos fúlvicos, más susceptibles a mineralización, por condiciones de manejo inadecuado en un sistema agrícola.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la composición química de AH provenientes de suelos Altoandinos de la microcuenca Santa Teresa, mediante diferentes técnicas espectroscópicas, análisis elemental, IRTF y $CPMAS^{13}$ CRMN, con el fin de determinar y predecir su comportamiento y reactividad química frente al cambio de uso de suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y Purificación de los AH

Los ácidos húmicos estudiados provienen de suelos de ecosistemas altoandinos 2850-3238 msnm (CRC 2002), clima frío húmedo de paisaje de montaña, orden de clasificación andisoles, asociación *Typic Hapludands* (IGAC 2009). El muestreo se realizó en la microcuenca Santa Teresa (subcuenca río Las Piedras), departamento del Cauca y se seleccionaron unidades de muestreo de tres usos bosque, cultivo de papa y pastura, a una profundidad de 20 cm, 20 cm y 10 cm respectivamente. El tipo de vegetación predominante del bosque es *Freziera canescens* (motilón) y en menor proporción *Weinmannia tomentosa* (encenillo) *y Cinchona pubescens* (Quina).

Para aislar los AH primero se obtiene la materia orgánica humificada (MOH) mediante el método granulométrico de tamizaje en húmedo a través de mallas 100 y 53 µm, el cual se fundamenta en que los agregados del suelo considerados normalmente estables en agua, se disocian por tratamiento mecánico moderado, en microagregados y complejos orgánico-arcillosos, que posteriormente serán separados por granulometría (Mosquera *et al.*, 2006, Mosquera *et al.*, 2007). Para separar dichas fracciones se utiliza un tamizador automático (Retsch As200®). Posteriormente se realiza la separación de la MOH en las fracciones: AH, AF y huminas, mediante extracción sucesiva con soluciones básicas de tetraborato, pirofosfato e hidróxido de sodio (0,1N) (Nierop *et al.*, 2005) y centrifugación a 16.508 x g por 20 minutos. Los AH se separan de la fracción fúlvica por precipitación con H_2SO_4 concentrado a pH 1 y centrifugación a 16.508 x g por 20 minutos. Se

disuelven en NaOH 0,5N. La purificación de los AH se hace mediante precipitación con HCl hasta pH 1, redisoluciones en NaOH, centrifugación a alta velocidad 23.771 x g por 12 minutos, tratamiento con una mezcla de ácidos HCl-HF al 1% y diálisis por 48 h a través de membranas de celulosa de 12000 Daltons. Por último se liofilizan en un equipo Labconco, modelo FreeZone 4.5 para su posterior caracterización.

Caracterización química de los Ácidos Húmicos

La caracterización espectroscópica se realizó en el Centro de Instrumentación Científica de la Universidad de Granada (España) y en el Centro de Investigación, Tecnología e Innovación CITIUS de la Universidad de Sevilla (España).

La composición elemental C, H, N, S, O fue determinada usando un analizador elemental Thermo Scientific Modelo Flash 2000. La relación E_4/E_6 fue calculada como la relación de absorbancias a 465 y 665 nm de los AH disueltos en $NaHCO_3$ 0,05N, medidas en un espectrofotómetro Thermo electron corporation UV-VIS modelo Helios Γ.

Los Espectros infrarrojo con transformada de Fourier (IRTF) fueron obtenidos de pastillas con una concentración de muestra al 2% en KBr grado espectro métrico, utilizando un espectrómetro JASCO FT/IR 6200 tipo A.

La resonancia magnética nuclear de estado sólido ($CPMAS^{13}CRMN$) en los AH se realizó en un equipo Bruker 600 WB PLUS bajo los parámetros de adquisición según Kang (2003). Una frecuencia del ^{13}C de 150 MHz, velocidad de giro del rotor de 10 KHz, un tiempo de recirculación de 4 s y de adquisición de 5 ms. El tiempo de contacto del CP entre los dos núcleos H y C fue de 1 ms y el número de escaneos de 5000 a 10000. Se usó el área total como referencia para la integración.

Análisis Elemental

La composición elemental de los AH, se muestra en la Tabla 1.

El contenido de C del AH de cultivo es significativamente superior al de pastura y este a su vez significativamente superior al de bosque. Se observan diferencias significativas en los contenidos de H siendo el AH de pastura significativamente superior al de bosque y al de cultivo (*p<0.05).* La tendencia en los contenidos de Nitrógeno es similar a la de H. El contenido de O es significativamente superior en AH - bosque, seguido de cultivo y pastura. En cuanto al S no se aprecia diferencia significativa entre los contenidos de AH- bosque y AH-pastura, *(p=0,267),* pero su contenido es significativamente superior al S de AH-cultivo.

La relación atómica C/N de AH-cultivo es significativamente superior a la de bosque y pastura. La relación C/H tal como en los AH de diferente uso estudiados por Senesi *et al*., (2003) es cercana a 1 lo que indica un carácter alifático/aromático, existiendo diferencia significativa entre los AH de los tres usos (p= 0.020). La relación C/O de los tres usos es significativamente diferente (p=0.018).

La relación E4/E6 para los AH se encuentran dentro del valor referenciado por Senesi *et al*., (2003) e incrementa significativamente de 4,06 a 5,16 coincidiendo con la disminución del contenido de C, mostrando que el AH de bosque presenta una estructura menos condensada que la de pastura y cultivo. Esta relación es más alta que la encontrada en andisoles antioqueños sometidos a explotación agropecuaria (Jaramillo 2011), lo que indica, que los AH estudiados tienen menor grado de condensación, probablemente debido a la diferencia en la altitud de la zona.

Por lo tanto la mayor captura de C la presentan los AH de cultivo, con mayor grado de condensación en su estructura y aromaticidad deducible de su mayor relación C/H. Probablemente el aporte de los abonos orgánicos utilizados en el cultivo influye en la composición química de sus ácidos húmicos mostrando mejores condiciones de aromaticidad y captura de C.

Tabla 1. Composición elemental (%), relación atómica de los tres ácidos húmicos estudiados y relación E_4/E_6.

Muestra	C	H	N	S	O	C/H	C/O	C/N	E_4/E_6
AH - cultivo	48,89^a	4,62^c	3,53^c	0,14^b	42,82^b	0,88^a	1,52	16,16^a	4,07^c
AH - bosque	46,64^c	5,77^b	3,81^b	0,18^a	43,6^a	0,67^b	1,43	14,28^b	5,15^a
AH - pastura	47,67^b	6,1^a	4,48^a	0,21^a	41,54^c	0,65^c	1,53	12,41^c	4,64^b

Promedios con letras diferentes son significativamente diferentes *p=0,05* Prueba Duncan.

Sin embargo, los AH de bosque presentan menor contenido de C y menor relación C/O, indicando mayor grado de oxidación en sus cadenas laterales atribuible a mejores condiciones de aireación y mayor actividad bioquímica. Autores como Rosell, Arshad, Schnitzer obtuvieron resultados similares con RMN de estado sólido y señalaron que el fortalecimiento de las actividades bioquímicas que se observa en el suelo bajo el sistema de labranza cero resulta en mayores cantidades de hidratos de carbono, aminoácidos y azúcares aminados, y menor aromaticidad que en el suelo bajo la práctica de labranza convencional (Piccolo 1996).

Si se compara pastura con bosque los AH del primer uso presentan mayor contenido de C y mayor contenido de H, indicando que hay mayor presencia de C Alifático y sus cadenas laterales estarían menos oxidadas (>C/O), probablemente por menor actividad biológica o por procesos de compactación del suelo.

Espectroscopia Infrarroja

Los espectros IRTF de los AH extraídos de suelos altoandinos se muestran en la figura 1. Todos los espectros presentan bandas de absorción similares entre sí e integradas en las siguientes regiones: una intensa banda entre 3379 y 3362 cm^{-1} atribuida al estiramiento del enlace de hidrógeno de los grupos OH y vibraciones de tensión N-H que indica la posible presencia de grupos amino.

La alta intensidad a 2919 – 2849 y presencia de la banda a 1450 cm^{-1} observada en todos los espectros, indica alto contenido de componentes alifáticos, siendo menor para AH- cultivo, representando características de enlace de estiramiento CH_2 y vibraciones en cadenas alquílicas largas en compuestos de lípidos (Spaccini 2009), esto confirma los resultados del análisis elemental. Una banda entre 1724-1717 cm^{-1} que corresponde a estiramiento C=O, principalmente de grupos carboxílicos COOH y una banda a 1620 cm^{-1} se atribuye a estiramiento C=C aromático y estiramiento simétrico COO^- (Senesi 2003).

La presencia de polisacáridos fue confirmada por los picos en 1030 y 1076 cm^{-1} que suelen atribuirse a sus estiramientos C-O.

La presencia de compuestos aromáticos policíclicos en los AH se evidencia por la señal a 3069 cm^{-1}, relacionada con el estiramiento C-H en los anillos aromáticos, de intensidad más débil para el AH-pastura y AH-bosque posiblemente debido a la extensa sustitución de anillos aromáticos en las macromoléculas de estos AH. También la presencia de un pico de intensidad débil a 1388 cm^{-1} en los tres AH que corresponde a las vibraciones de flexión de OH fenólicos. Iguales bandas se observan en AH extraídos de compost (Spaccini 2009) a pesar de que su proceso de formación no es de origen pedogenetico.

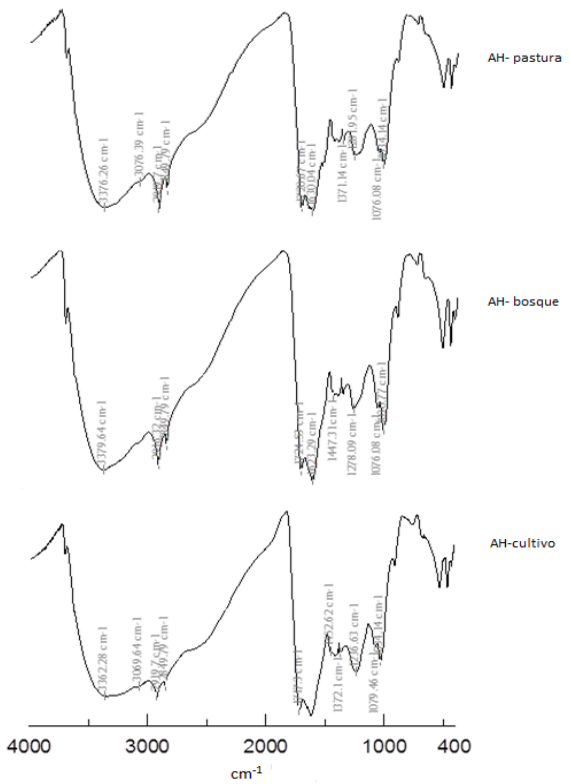

Figura 1. Espectros IRTF de AH-pastura, AH-bosque y AH-cultivo

Resonancia magnética nuclear de estado sólido (CPMAS^{13}CRMN)

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear de estado sólido provee información sobre las diversas asociaciones químicas del 13C en los AH (Buurman *et al.*, 2009), permitiendo este estudio discriminar regiones específicas para cada tipo de carbono (C) que se observan en los espectros de la figura 2 así: 0~50 ppm C-alquilo, 50~110 ppm C-alquilo de grupos metoxi ó -CH_2OH, 110~160 ppm C-aromático, 160-220 ppm C de grupo carbonilo ó fenol en cultivo, bosque y pastura como se muestra en la Tabla 2. Los porcentajes relativos de distribución de carbono obtenidos por integración de las señales de las diferentes regiones de desplazamiento, permiten determinar la aromaticidad de los ácidos

húmicos (Kang *et al.* ,2003), dada por la relación entre la región de C aromático (110 ~ 160 ppm) y la región total de C alifático (0~110 ppm) como se detalla en la Tabla 2. El AH-pastura presenta mayor grado de alifaticidad, seguida de AH-bosque y AH-cultivo mientras AH-cultivo contiene la mayor cantidad de aromáticos incluyendo fenoles. El grado de aromaticidad se registra en orden descendente para el AH-cultivo, AH-bosque y AH-pastura consistente con la reducción de la relación C/H, confirmando los resultados del análisis elemental en el sentido de que el AH-cultivo presenta mayor grado de condensación.

Tabla 2. Porcentajede distribución de ^{13}C en diferentes regiones de desplazamiento químico (ppm) en los espectros de CPMAS^{13} CRMN de los tres o ácidos húmicos estudiados.

Muestra	220~160 C-carbonilo ó fenol	160~110 C aromático	110~50 C - metoxi ó - CH_2OH	0~50 C-alquilo	Aromaticidad*
AH - cultivo	18,6	20,1	29,1	32,2	0,33
AH - bosque	10,2	10,46	30,0	49,5	0,13
AH - pastura	8,4	6,61	26,7	59,2	0,08

*aromaticidad: C aromático (110 ~ 160 ppm)/Suma de C alifático (0~110 ppm)

Los espectros de los AH estudiados figura 2, muestran una composición dominada por un pico intenso de C alifático a 31.150 ppm, atribuido a grupos metileno en cadenas largas alquílicas (Senesi *et al.*, 2003) ó grupos de CH_2 derivados de varios compuestos lipídicos (Spaccini *et al.*, 2009). Los espectros de los tres AH obtenidos muestran la presencia del desplazamiento entre 160 y 180 ppm típica de AH, tomado en otros estudios previos (Senesi *et al.*, 2003) como referencia para la integración de las regiones del espectro.

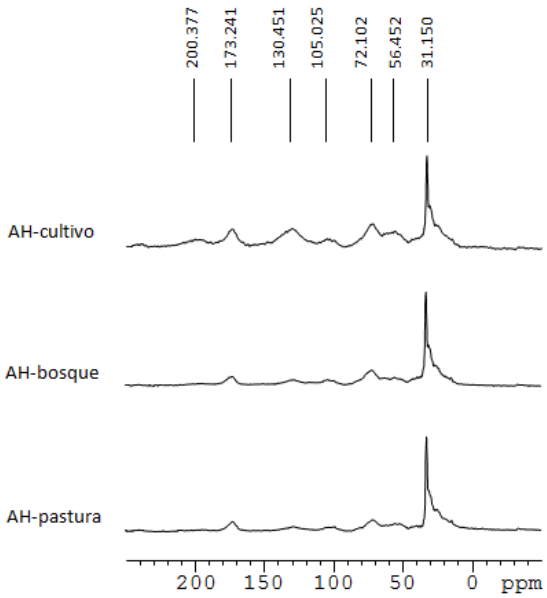

Figura 2. Espectros CPMAS^{13}CRMN de AH-cultivo, AH-bosque y AH-pastura

CONCLUSIONES

La composición química de los ácidos húmicos provenientes de tres usos de suelos Altoandinos de la microcuenca Santa Teresa, departamento del Cauca, estudiada mediante diferentes técnicas espectroscópicas, muestra variaciones significativas, presentando los AH de cultivo contenido superior de C con mayor grado de aromaticidad y condensación, contribuyendo a una mayor captura de carbono que los correspondientes a pastura y bosque, mostrando la influencia del cambio de uso de suelo. Los ácidos húmicos de bosque presentan alto grado de oxidación en sus cadenas laterales indicando la alta actividad bioquímica presente en estos suelos. De los ácidos húmicos de pastura se resalta el alto contenido de C alifático y menor grado de oxidación de sus cadenas laterales, siendo más susceptible a cambios por efectos antropogénicos o climáticos.

Agradecimientos.

Los autores agradecen al Departamento de Edafología y Química Agrícola de la Universidad de Granada (España) por el apoyo logístico, académico y económico en la realización de este trabajo. A la VRI de la Universidad del Cauca por su apoyo económico y por facilitar su desarrollo, a los estudiantes del grupo de Agroquímica por la colaboración en la parte experimental.

REFERENCIAS

BUURMAN P, NIEROP KGJ, KAAL J, SENESI N (2009) Analytical pyrolysis and thermally assisted hydrolysis and methylation of EUROSOIL humic acid samples — A key to their source. Geoderma 150 (1-2): 10-22.

CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA CRC (2006) Plan de Ordenamiento y Manejo de la Subcuenca Hidrográfica del río Las Piedras. Corporación Autónoma Regional del Cauca, Popayán, 42-53, 79-88p.

CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL CAUCA CRC (2002) Plan de Ordenamiento Territorial [online] [Citado en 3 de agosto de 2011]. Disponible en internet: <http://www.crc.gov.co/files/ConocimientoAmbiental/POT/popayan/1%20FINAL%20AMBIENTAL.pdf>. Popayán, 224p.

INSTITUTO GEOGRÁFICO AGUSTÍN CODAZZI IGAC (2009) Estudio General de suelos y zonificación de tierras departamento del Cauca. Instituto Geográfico Agustín Codazzi, Bogotá, 556p.

INTERGOVERNMENTAL PANEL ON CLIMATE CHANGEIPCC (2000) Land use, land-use change, and forestry. Cambridge University Press, 30p.

JARAMILLO JDF (2011) Caracterización de la materia orgánica del horizonte superficial de un andisol hidromórfico del oriente antioqueño (Colombia). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 35 (134): 23-33.

KANG S, AMARASIRIWARDENA D, VENEMARIN P, XING B (2003) Characterization of ten sequentially extracted humic acids and a humin from a soil in Western Massachusetts. Soil Science 168 : 12. 880-887

LÓPEZ L, LO MÓNACO S, MÉNDEZ B (2003) Caracterización de la materia orgánica extraída de suelos por diferentes técnicas. Rev.Fac.Agro. Maracay, 29: 257-283.

MOSQUERA CS, BRAVO I, y HANSEN EW (2007) Comportamiento Estructural de los ácidos húmicos obtenidos de un suelo Andisol del Departamento del Cauca. Revista Colombiana de Quimica 36: 1, 31-41.

MOSQUERA VC, BRAVO RI (2006) Comportamiento de los ácidos húmicos en medio básico. Suelos Ecuatoriales 36: 1, 36-42.

NAAFS, DFW (2004) What are humic substances? A molecular approach to the study of organic matter in acid soils. Utrecht Holanda.

NIEROP KGJ, VAN BERGEN P F, BUURMAN P, VAN LAGEN B (2005) NaOH and Na4P2O7 extractable organic matter in two allophanic volcanic ash soils of the Azores Islands—a pyrolysis GC/MS study. Geoderma 127 (1-2): 36-51.

PICCOLO A (1996). Humic substances in terrestrial ecosystems. El Sevier Science B.V, Italia, 62, 85p

RODRIGUEZ B, ESPANA M, y CABRERA DE BISBAL E (2004) Propiedades químico-estructurales de la materia orgánica del suelo en un agro sistema de los llanos centrales venezolanos bajo diferentes prácticas de manejo. INCI 29 (8): 461-467.

SENESI N, D'ORAZIO V, RICCA G (2003. Humic acids in the first generation of Eurosoils. Geoderma 116: 325-344

SPACCINI R, PICCOLO A (2009) Molecular characteristics of humic acids extracted from compost at increasing maturity stages. Soil Biology & Biochemistry 41:1164-1172.

TOBÓN C (2009) Los bosques andinos y el agua. Serie investigación y sistematización. Programa Regional ECOBONA – INTERCOOPERATION, CONDESAN Quito,19-22, 69-75 p.

VAN DER KAMP J, YASSIR I, BUURMAN P (2009) Soil carbon changes upon secondary succession in Imperata grasslands (East Kalimantan, Indonesia). Geoderma 149 (1-2): 76-83.