

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE
ÁCIDOS FÚLVICOS DE DOS SUELOS COLOMBIANOS
(Andisol del Cauca y Oxisol del Amazonas).**

JEANETTE ROCIO DÁVILA CALDERON

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ÁCIDOS FÚLVICOS DE DOS
SUELOS COLOMBIANOS (Andisol del Cauca y Oxisol del Amazonas).**

JEANETTE ROCIO DÁVILA CALDERON

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

**CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ÁCIDOS FÚLVICOS DE DOS
SUELOS COLOMBIANOS (Andisol del Cauca y Oxisol del Amazonas).**

JEANETTE ROCIO DÁVILA CALDERON

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

Director

Mg. Isabel Bravo Realpe
Universidad del Cauca.

Codirector

Qco. Adriana Zamudio Sánchez
Instituto Geográfico Agustín Codazzi

**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
POPAYÁN
2002**

Nota de Aceptación

Director trabajo de grado

Jurado

Jurado

Fecha de sustentación: Popayán, Junio 21 de 2002

*A mis padres y familia, por su
inmenso apoyo con
todo mi amor.*

AGRADECIMIENTOS

A Dios y Maria Auxiliadora, por darme la oportunidad de alcanzar mis metas y el ánimo para seguir adelante.

Al Departamento de Química de la Universidad del Cauca por la formación recibida, en especial al grupo de Agroquímica.

A la subdivisión de Agrología del Instituto Geográfico Agustín Codazzi (Bogotá), por permitir el desarrollo del trabajo, en especial al Laboratorio de Suelos y todo personal que labora en él.

A Isabel Bravo, por su constante dirección, guía y consecución del presente trabajo.

A Adriana Zamudio, por su ayuda y motivación.

A la Doctora Maria del Pilar Triana y Al Doctor Carlos Pulido, por la colaboración recibida.

A Rohm y Hass, por suministrarme las resinas para el desarrollo del trabajo.

A Ingeominas y al Instituto Nacional de Inmunología (Bogotá), por permitirme realizar algunos análisis de caracterización.

Y en fin, a muchas personas importantes que me apoyaron de diversas maneras para el desarrollo y culminación de este proyecto, tanto en Bogotá como en Popayán.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
2. JUSTIFICACIÓN	6
3. OBJETIVOS	11
4. MARCO TEORICO	12
4.1. Naturaleza de las Sustancias Húmicas	13
4.2. Extracción de las Sustancias Húmicas	14
4.3. Los Ácidos Húmicos	15
4.4. Las Huminas	16
4.5. Los Ácidos Fúlvicos	17
4.6. Purificación de los Ácidos Fúlvicos	19
4.7. Caracterización de los Ácidos Fúlvicos	22
4.8. Los Oxisoles	23
4.9. Los Andisoles	24
5. MATERIALES Y METODOS	27
5.1. Materiales	27
5.1.1. Andisol	27
5.1.2. Oxisol	28
5.2. Análisis Físicos y Químicos de los suelos	28
5.2.1. Físicos	28
5.2.2. Químicos	29

	Pág.
5.3. Separación de la Materia Orgánica Fresca (MOF) de la Materia Orgánica Humificada (MOH)	31
5.3.1. Método Granulométrico	31
5.3.2. Método Densimétrico	32
5.4. Extracción y Separación de las Sustancias Húmicas	34
5.4.1. Extracción de la Humina Heredada	34
5.4.2. Extracción de Huminas, Ácidos Húmicos y Ácidos Fúlvicos	36
5.4.2.1. Extracción de la Humina	36
5.4.2.2. Separación de los Ácidos Fúlvicos y los Ácidos Húmicos	39
5.5. Purificación de los Ácidos Fúlvicos	39
5.5.1. Eliminación de sales de la Fracción Fúlvica	41
5.5.2. Determinación de la efectividad de la purificación de los Ácidos Fúlvicos	42
5.2.2.1. Análisis de Microscopía Pretrográfica	42
5.2.2.2. Análisis Infrarrojo	43
5.6. Caracterización de los Ácidos Fúlvicos	43
5.6.1. Análisis Elemental	43
5.6.2. Determinación de Acidez Total	43
5.6.3. Espectroscopia Infrarroja	44
5.6.4. Espectroscopia Ultravioleta. Relación E ₄ /E ₆	45
5.6.5. Filtración a través de sephadex G-25	45
5.6.6. Análisis de Microscopía Pretrográfica de los Ácidos Fúlvicos	46
6. RESULTADOS Y ANÁLISIS	47
6.1. Análisis Físicos y Químicos	47
6.2. Separación de la materia Orgánica Libre de La Materia Orgánica Humificada	50
6.2.1. Separación Granulométrica	50
6.2.2. Separación Densimétrica	51
6.2.3. Porcentajes de Carbono	52
6.3. Extracción y separación de las Sustancias Húmicas	54
6.3.1. Extracción de la Humina Heredada	55
6.3.2. Extracción de la Humina, Ácidos Húmicos y Ácidos Fúlvicos	55
6.3.2.1. Extracción de la Humina	55
6.3.2.2. Separación de los Ácidos Fúlvicos y Ácidos Húmicos	56

	Pág.
6.4. Purificación de los Ácidos Fúlvicos	64
6.4.1. Purificación de la Fracción Fúlvica	64
6.4.2. Determinación de la Purificación de los Ácidos Fúlvicos	67
6.4.2.1. Análisis de Microscopía Pretrográfica.	67
6.4.2.2. Análisis Infrarrojo	68
6.5. Caracterización de los Ácidos Fúlvicos	68
6.5.1. Análisis elemental de los Ácidos Fúlvicos	68
6.5.2. Acidez Total y Relación $E_{4/6}$	70
6.5.3. Análisis Infrarrojo	72
6.5.4. Filtración a través de sephadex G-25	76
6.5.5. Análisis de Microscopía Pretrográfica de los Ácidos Fúlvicos	78
7. CONCLUSIONES	79
8. BIBLIOGRAFÍA	81
9. RECOMENDACIONES	85
10. ANEXOS	86
A. Curvas de Acidez Total	86
B. Perfiles de elusión sephadex G-25	90

INDICE DE TABLAS

Tabla	Pág.
Tabla 1. Análisis Físicos y Químicos de del Andisol y Oxisol HA y HB	47
Tabla 2. Distribución de fracciones de acuerdo con el método granulométrico.	50
Tabla 3. Fracciones obtenidas mediante el método densimétrico	51
Tabla 4. Porcentaje de Carbono para Andisol	52
Tabla 5. Porcentaje de Carbono para Oxisol	53
Tabla 6. Resultados de %CHN de Materia Orgánica Inicial (MOI) y Materia Orgánica Humificada (MOH)	54
Tabla 7. Resultado de Humina Heredada	55
Tabla 8. Peso final de la Humina (% C No extractable)	56
Tabla 9. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Andisol	57
Tabla 10. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte B del Andisol	58

	Pág.
Tabla 11. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Oxisol	59
Tabla 12. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte B del Oxisol	60
Tabla 13. Porcentaje de Carbono de AH y AF con diversos extractantes	61
Tabla 14. Resultados de purificación secuencial de Fracción Fúlvica	66
Tabla 15. Resultados CHN Leco-600 para AF	69
Tabla 16. Resultados de Acidez total y relación E_4/E_6	70
Tabla 17. Resultados filtración a través de Sephadex G-25	77

INDICE DE FIGURAS

Figura	Pág.
Figura 1. Porcentaje de Carbono de MOL y MOH para Andisol	52
Figura 2. Porcentaje de Carbono de MOL y MOH para Oxisol	53
Figura 3. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Andisol	57
Figura 4. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte B del Andisol	58
Figura 5. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Oxisol	59
Figura 6. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte B del Oxisol	66
Figura 7. Muestra sometida a purificación con Membrana de diálisis	67
Figura 8. Muestra sometida a purificación con resina de adsorción Amberlita XAD-16, resina de intercambio (Rexyn 101H) y membrana de diálisis.	67
Figura 9. IR de AF purificados por membrana de diálisis	68
Figura 10. Espectros IR Andisol HA con los 3 extractantes	73

	Pág.
Figura 11. Espectros IR Andisol HB con los 3 extractantes	73
Figura 12. Espectros IR Oxisol HA con los 3 extractantes	74
Figura 13. Espectros IR Oxisol HB con los 3 extractantes	74
Figura 14. Imagen de Ácidos Fúlvicos del Andisol HA extracción con Tetraborato de Sodio con Microscopía Pretrógráfica	78
Figura 15. Imagen de Ácidos Fúlvicos del Oxisol HA extracción con Tetraborato de Sodio con Microscopía Pretrógráfica	78

INDICE DE ESQUEMAS

Esquema	Pág.
Esquema 1. Separación Granulométrica	32
Esquema 2. Separación Densimétrica	33
Esquema 3. Extracción de la Humina Heredada	34
Esquema 4. Extracción de la Humina	36
Esquema 5. Separación de los Ácidos Fúlvicos y los Ácidos Húmicos	39
Esquema 6. Eliminación de sales de la Fracción Fúlvica	41
Esquema 7. Determinación de Acidez Total	44
Esquema 8. Relación E_4/E_6	45
Esquema 9. Filtración a través de sephadex G-25	46

ACRÓNIMOS

AF	Ácidos Fúlvicos
AH	Ácidos Húmicos
CIC	Capacidad de Intercambio Catiónico
FF	Fracción Fúlvica
HA	Horizonte A
HB	Horizonte B
IR	Infrarrojo
MO	Materia Orgánica
MOF	Materia Orgánica Fresca
MOH	Materia Orgánica Humificada
MOL	Materia Orgánica Libre
MI	Muestra Inicial
% CAF	Porcentaje de Carbono de Ácidos Fúlvicos
% CAH	Porcentaje de Carbono de Ácidos Húmicos

RESUMEN

En este trabajo se caracterizaron los Ácidos Fúlvicos en dos horizontes de dos tipos de suelo : Un Andisol del Cauca y un Oxisol de la Amazonia Colombiana. Las muestras fueron sometidas previamente a una separación tanto granulométrica como densimétrica, demostrando que la combinación de ellas recupera más Materia Orgánica Humificada. En ambos tipos de suelo se encontró un mayor porcentaje de carbono en la Materia Orgánica Humificada en el horizonte A que en el B.

La extracción de las Sustancias Húmicas se realizó de manera secuencial utilizando Tetraborato de Sodio, Pirofosfato de Sodio e Hidróxido de Sodio, deduciendo que es una adecuada metodología, pues cada extractante actúa sobre uniones diferentes con la Materia Orgánica.

En la purificación de los Ácidos Fúlvicos se combinaron metodologías que incluyen el uso de resinas de adsorción e intercambio y/o membranas de diálisis, consiguiéndose con esto una mejor purificación para una óptima liofilización.

En la caracterización de los Ácidos Fúlvicos se encontraron diferencias en la naturaleza estructural de los mismos. Pues el Oxisol presenta un mayor grado de condensación y sus moléculas son más complejas de acuerdo a los análisis realizados con la relación E_4/E_6 y acidez total. Los análisis por Infrarrojo mostró el predominio de los grupos OH fenólico por sus bandas definidas e intensas alrededor de 3430 y 1150 cm^{-1} . De otro lado el análisis con gel sephadex dedujo que en los Ácidos Fúlvicos analizados prevalecen moléculas de pesos moleculares mayores a 5000.

INTRODUCCION

La materia orgánica del suelo, está compuesta por un amplio grupo de sustancias provenientes de tejidos vegetales, animales y células microbianas no descompuestas, pasando por productos de descomposición de corta duración, hasta material estable amorfo sin vestigios de la estructura anatómica del material original (1).

Su aplicación en la agricultura es milenaria, hoy en día numerosos investigadores reconocen los efectos benéficos de esta práctica, en cuanto a las mejoras que se observan en las características químicas, físicas y biológicas del mismo. La materia orgánica forma parte del ciclo del nitrógeno, del azufre y del fósforo, contribuye a la asimilación de nutrientes, mejora la estructura y la retención de agua del suelo y da soporte a todo un mundo de microorganismos cuya actividad resulta ventajosa para el cultivo (2).

En su mineralización, los residuos sufren un proceso de degradación o descomposición de los componentes elementales de las proteínas, carbohidratos y otros. Los productos resultantes pueden ser objeto de nuevos procesos de resíntesis y polimerización, en un proceso llamado humificación, dando lugar a nuevos agregados químicos que reciben el nombre de humus (2).

El método clásico de fraccionamiento del humus da lugar a la separación de las sustancias húmicas de acuerdo a su solubilidad y se clasifican en ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

Se definen los Ácidos Fúlvicos como las sustancias humificadas solubles en medio ácido y básico. Sin embargo, es frecuente obtener con ellos una variada gama de sustancias como carbohidratos, glucósidos, sustancias de naturaleza fenólica, ácidos urónicos y ácidos orgánicos nitrogenados que no pueden considerarse estrictamente como humus.(5)

Se ha formulado que la materia orgánica ejerce un control sobre la actividad del Aluminio en la solución del suelo, por la posible combinación de diferentes mecanismos tales como la adsorción sobre su superficie, la elevación del pH que genera polimerización y/o precipitación del Aluminio, este efecto en su mayor parte se atribuye a los ácidos húmicos. Igualmente se sabe que los ácidos fúlvicos entran fácilmente a los intersticios de la red cristalina de las arcillas, movilizándolo Hierro y Aluminio, que se vuelven solubles y causan problemas al suelo, ya que ocasionan acidez y disminución de las bases de cambio. La acidez da origen a suelos improductivos por la consecuente fijación de Fósforo, Boro y pérdida de otros nutrientes (1).

La gran mayoría de investigaciones se han encaminado a la purificación y cuantificación de los ácidos húmicos, encontrándose pocos resultados en la literatura pertinentes a los ácidos fúlvicos, ya que no son fácilmente recuperables (3).

Con este trabajo se pretende implementar una metodología apropiada para la extracción y purificación de los ácidos fúlvicos provenientes de dos tipos de suelos, un Andisol de la zona cafetera del departamento del Cauca y un Oxisol del Amazonas. Estos suelos fueron seleccionados con el objeto de determinar si existe relación entre la estructura general de los ácidos fúlvicos y el tipo de ecosistema de origen y poder profundizar en el conocimiento de su dinámica en el suelo. En el capítulo del marco teórico se describirán las características de los dos tipos de suelos a estudiar.

1 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

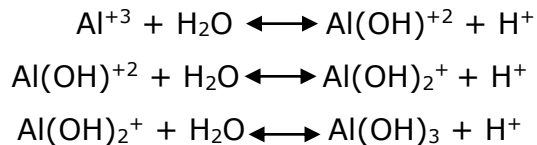
Los efectos benéficos de la Materia Orgánica (MO) se atribuyen principalmente a su alto grado de humificación, una de las formas de medir este grado de humificación es mediante a relación Ácidos Húmicos /Ácidos Fúlvicos (AH/AF); si es mayor de uno la materia orgánica presenta un alto grado de humificación, significando que deben prevalecer los Ácidos Húmicos (AH) sobre los Ácidos Fúlvicos(AF), ya que los AH son moléculas mucho más condensadas y polimerizadas que éstos últimos, presentando mayores valores de Capacidad de Intercambio Catiónico por lo que retienen más nutrientes para las plantas, además de que se unen fuertemente a la fracción mineral del suelo para suministrar una adecuada bioestructura.

Los ácidos fúlvicos no se forman solamente en suelos ácidos, sino en todos los suelos, prevaleciendo donde las condiciones para la vida microorganica son precarias (4). También en altitudes superiores a los 2000 metros sobre el nivel del mar donde el clima es frío, se da el predominio de los ácidos fúlvicos así como también en suelos encharcados o bajo condiciones anaeróbicas.

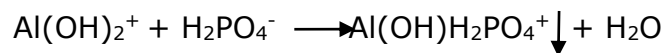
Los ácidos fúlvicos con su estructura simple y su pequeño tamaño (2 \AA) entran fácilmente en los intersticios de la red cristalina del suelo, movilizandoo Fe y Al, igualmente solubilizan Ca y Mg con los que se ligan. Pero como los fulvatos, es decir las sales de los ácidos fúlvicos, son muy móviles y completamente hidrosolubles, percolan con facilidad en el suelo, lixiviándolo, empobreciéndolo

y causando acidez al suelo.

La acidez causada por el Aluminio ocasiona insolubilización del Fósforo en la solución del suelo y esto se explica por su hidrólisis para formar un complejo monomérico y polimérico hidroxialumínico de acuerdo a las siguientes reacciones (44):



Los complejos hidroxialumínico precipitan el Fósforo, macronutriente muy importante en la nutrición vegetal. Una de las formas de insolubilizar el Fósforo es por intercambio aniónico así:



El inadecuado uso de fertilizantes y plaguicidas en regiones cafeteras como las de Cajibío en el Cauca, cuyo tipo de suelos pertenece a los Andisoles, está ocasionando en el suelo una acumulación de capas sucesivas de Materia Orgánica, sin que ocurra un verdadero proceso de humificación, lo que induce a obtener un humus con bajo grado de humificación, prevaleciendo por lo tanto los Ácidos Fúlvicos, que ocasionarían alta acidez con las consecuencias ya mencionadas.

De otra parte en suelos de la Amazonía que corresponden a los oxisoles, existe un alto grado de meteorización, que también conduce a una fuerte acidez, en donde probablemente prevalecen los Ácidos Fúlvicos sobre los Ácidos Húmicos. Las condiciones físicas y químicas del suelo seguramente influyen en el tipo de humificación, así como cada ecosistema tiene condiciones climáticas diferentes que seguramente influyen en este.

Estudiando la naturaleza química de los Ácidos Fúlvicos sería posible tener un conocimiento más adecuado de su comportamiento en el suelo. Sin embargo las sustancias húmicas se forman durante el proceso de humificación, a partir de residuos de diferente composición. Aquí radica la dificultad de extraer fracciones de composición química no homogénea; además, los procesos de extracción introducen modificaciones más ó menos profundas en los materiales, probablemente por reacciones de hidrólisis y condensación (6).

Otra dificultad proviene del hecho de que las sustancias orgánicas del suelo están ligadas a través de grupos hidroxilos fenólicos, carboxílicos alifáticos y aromáticos y grupos aminados, a los minerales arcillosos por formación de enlaces con cationes bi y trivalentes, por fuerzas de Van Der Wals, y por puentes de hidrógeno.

En la literatura hay varios reportes relacionados con el tema (Kimura, Zalva) (7) y (8), donde se encuentra un amplio contenido en cuanto a la investigación de los ácidos húmicos, sin embargo se reporta que para los fúlvicos se presentan grandes dificultades en eliminar las impurezas orgánicas y minerales, por esto se planteó esta investigación en un interés por el estudio de la extracción, purificación y caracterización preliminar de estos componentes del humus en los dos tipos de suelo.

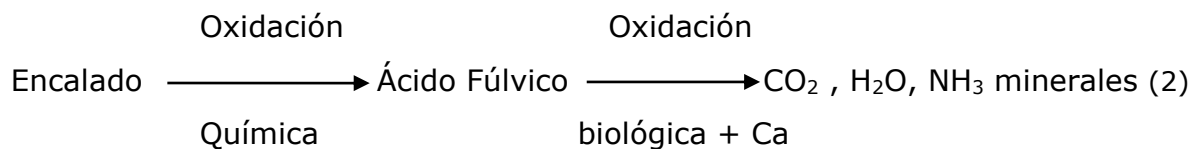
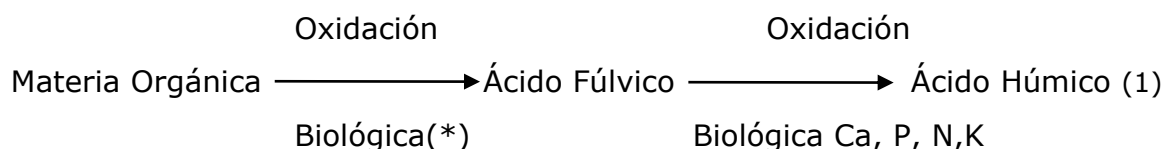
2 JUSTIFICACION

Según Ferrari (30), los compuestos húmicos presentes en la materia orgánica se clasifica en dos grupos principales: el primero está formado por varias sustancias nitrogenadas y no nitrogenadas de naturaleza individual, tales como carbohidratos, ácidos orgánicos, ceras, grasas, resinas, etc. El segundo grupo está formado por sustancias cuyo origen y naturaleza no son completamente conocidos, pero pueden aislarse del suelo como compuestos naturales; estas son las sustancias estrictamente húmicas: ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas.

En la actualidad, la Subdirección de Agrología del Instituto Geográfico Agustín Codazzi, está desarrollando un proyecto de investigación en el Laboratorio de Suelos, sobre la naturaleza y dinámica de las sustancias húmicas en suelos colombianos, centrando su interés en la purificación y caracterización de los ácidos fúlvicos (29).

Las muestras seleccionadas para la realización del trabajo son: Un Andisol proveniente de los suelos Cafeteros del Cauca debido a las razones mencionadas anteriormente, y a que en esta región se está implementando el uso de abonos orgánicos provenientes en su mayoría de compostajes aerobios de período corto (< 15 días), período en el cual el contenido de ácidos fúlvicos es relativamente alto. La otra muestra es un Oxisol de la Amazonia Colombiana de características contrastantes al Andisol que proviene del muestreo que se realizó dentro del proyecto de investigación del IGAC, INPA III, suelos altamente intemperizado y con alto grado de acidez.

Ambos tipos de suelos son de carácter ácido y por lo tanto la degradación de la materia orgánica conduce especialmente a la formación de un humus con prevalencia de ácidos fúlvicos. Además, en este tipo de suelos se generan cantidades apreciables de Fe y Al que conduce a la inmovilización o retención de Fósforo, Boro y Molibdeno, lo que causa deficiencias de estos elementos en los cultivos. Las prácticas agrícolas comunes utilizan el encalamiento para elevar el pH y precipitar el Al, pero un excesivo encalamiento conlleva nuevamente a la oxidación química de los ácidos húmicos formando nuevamente ácidos fúlvicos. Esto se explica, porque en los suelos ácidos y pobres no hay condiciones para una vida microorganica conveniente, faltando la continuación de la oxidación que, en adelante depende de la presencia de Calcio y Fósforo. Pero en un suelo alcalino, donde las condiciones de microvida se tornan nuevamente precarias, se produce la oxidación puramente química de los ácidos húmicos, formando nuevamente ácidos fúlvicos, que finalmente son mineralizados por las bacterias, este proceso se puede apreciar en las reacciones 1 y 2.



La etapa inicial para la caracterización de los Ácidos Fúlvicos es la separación de la materia orgánica fresca de la fracción humificada. Actualmente no existe un método preciso, mediante el cual se puedan separar los compuestos húmicos de la materia orgánica fresca; sin embargo tienen mayor aceptación los de tipo físico, estos se basan en dos principios: uno, que depende de las diferencias en densidad y el otro de las diferencias de tamaño entre los

constituyentes de los complejos orgánico-minerales y otras partículas del suelo (1).

La segunda parte de la caracterización, se refiere al estudio del humus propiamente dicho e incluye una serie de fraccionamientos, dentro de los cuales en primer lugar se tienen mediante la aplicación simultánea de ultrasonidos y líquidos densos, la separación de una fracción denominada humina residual, la cual se supone derivada directamente de la lignina.

En segundo lugar con el fin de minimizar las alteraciones químicas y obtener una extracción máxima, es necesario utilizar solventes polares con alta constante dieléctrica, y así favorecer la dispersión de las sustancias húmicas.

Los factores metodológicos que influyen en la extracción de la materia orgánica son: la relación suelo : solución extractora, el tiempo de extracción, la temperatura y el número de extracciones.

La etapa fundamental para una óptima caracterización de las sustancias húmicas, es la purificación de las mismas y en la mayoría de los estudios, la fracción de ácidos fúlvicos es descartada y solamente se analizan los ácidos húmicos. La razón de esto es que los Ácidos Fúlvicos no son fácilmente recuperables luego de la remoción de los ácidos húmicos. El filtrado contiene no solamente cantidades considerables de fracción mineral disuelta durante la extracción, sino sales formadas durante la neutralización.

Los Ácidos Fúlvicos por ser solubles en medio ácido, apenas son retenidos durante la percolación en columnas, por esto los métodos más apropiados para su purificación utilizan resinas de intercambio iónico, al respecto Schnitzer y

colaboradores (31), reporta buenos resultados en el paso de los Ácidos Fúlvicos empleando columnas de amberlita IR-120 H⁺.

Por otra parte los métodos de diálisis y electrodiálisis son bastante adecuados para ácidos húmicos, pero poco eficaces para Ácidos Fúlvicos bajo las mismas condiciones, pues al mismo tiempo que atraviesan las membranas las sustancias impurificantes, también lo hacen muchos compuestos de bajo peso molecular.

Aquí se pueden citar las técnicas de liofilización, en las cuales Hubert, 1971 afirma haber eliminado en gran proporción las cenizas acompañantes de Ácidos Fúlvicos aprovechando la pérdida por parte de la sílice de sus propiedades coloidales en el proceso de secado en frío. Por varios tratamientos alternativos con elusión con resinas de cambio, estos autores como Chefetz (19) y (31) consiguen rendimiento de purificación realmente notables.

Cuando no es posible la purificación de Ácidos Fúlvicos usando tratamiento de resinas, la diálisis exhaustiva con agua destilada es una alternativa menos satisfactoria utilizada como método de purificación. Si hay una concentración significativa de cationes polivalentes como Al³⁺, pueden formarse complejos húmicos-metálicos insolubles cuando la solución es neutralizada. Además la diálisis se puede llevar a cabo nuevamente diluyendo con ácido clorhídrico inicialmente hasta una concentración de cualquier catión polivalente que ha sido reducido significativamente. Técnicamente la fracción obtenida en este paso puede ser referenciada como fracción fúlvica en vez de Ácidos Fúlvicos.

En el trabajo realizado por Preston, (34) la purificación de la fracción de los Ácidos Fúlvicos solubles se realizó en una columna de polivinilpirolidina (PVP), la primera fracción fue eluída con hidróxido de sodio 0.1M y posteriormente pasada a través de una columna de Amberlita IR-120 H⁺, obteniendo los Ácidos Fúlvicos purificados.

De acuerdo a la revisión de literatura no existe un método preciso que describa la forma más adecuada de extraer y caracterizar Ácidos Fúlvicos en este tipo de suelos en Colombia y por esto no se ha podido elucidar exactamente su estructura, ni definir su peso molecular. Además cada ecosistema debe influir en el proceso de humificación y debe variar de acuerdo a la profundidad del suelo. Por esto se propone en este trabajo la separación y caracterización de Ácidos Fúlvicos de los dos tipos de suelos: el Andisol y el Oxisol y en dos de sus horizontes, el horizonte A (HA) y el horizonte B (HB) que es hasta donde llega la capa de Materia Orgánica y por lo tanto la capa arable.

()La oxidación Biológica o Humificación biológica, sucede cuando los organismos del suelo generan procesos bioquímicos íntimamente, por lo que se producen los Acidos Húmicos.*

3 OBJETIVOS

GENERAL

Seleccionar y aplicar metodologías apropiadas para la purificación y caracterización física y química de Ácidos Fúlvicos, en suelos provenientes de la zona cafetera del Cauca y de la Amazonía y establecer su posible relación con el tipo de ecosistema al cual pertenecen.

ESPECIFICOS

- Realizar la separación de Ácidos Fúlvicos de la materia orgánica de dos tipos de suelos Andisol y Oxisol.
- Conocer la prevalencia del tipo de unión entre la Materia Orgánica y la fracción mineral del suelo.
- Estudiar la efectividad de los procesos de purificación de Ácidos Fúlvicos mediante el uso de resinas iónicas y/o membranas de diálisis.
- Realizar la caracterización de los Ácidos Fúlvicos extraídos por medio de técnicas espectroscópicas como IR y UV-Visible, cromatografía de columna y otros análisis.
- Correlacionar la caracterización preliminar de los Ácidos Fúlvicos con el tipo de suelo proveniente.

4 MARCO TEORICO

La materia orgánica es indispensable para el mantenimiento de la micro y mesoestructura del suelo, y no hay duda de que la bioestructura y toda la productividad del suelo se basa en la presencia de la materia orgánica en descomposición o humificada. (1) Esto debido a que es la fuente de energía para los microorganismos del suelo, a la vez que les suministra los nutrientes esenciales nitrógeno, fósforo, azufre, etcétera. Igualmente regula la nutrición vegetal, proporciona una estructura favorable al suelo al actuar como cemento de unión entre las partículas, dando origen al complejo arcillo-húmico, favorece la retención de humedad por el suelo, incide sobre el balance hídrico y la erosión de los suelos, actúa de amortiguador al moderar los cambios de acidez e inactivar los elementos o compuestos orgánicos tóxicos añadidos al suelo por contaminación, contiene incluso el factor energético que produce la diferenciación, dentro del suelo, de capas sucesivas que se denominan horizontes.(35)

Esta materia orgánica está formada por una serie de componentes que van desde tejidos vegetales y animales poco alterados y productos efímeros procedentes de su descomposición, hasta un material de color pardo o negro, bastante estable, que no presenta semejanza alguna con las estructuras anatómicas de las que procede; es este último material el que normalmente se designa como humus(36) y suele representar del 60 al 90 por ciento de la materia orgánica total del suelo. (35) La materia orgánica del suelo, definida por la totalidad de las sustancias orgánicas presentes en el suelo incluye, también los organismos edáficos (biomasa del suelo) aunque esto no llega a representar, normalmente, más de un 5 % de la materia orgánica del suelo.

La distribución de la materia orgánica dentro del suelo no es homogénea, si no que depende de las características climáticas, tipo de vegetación y utilización de los suelos. (35) Además este contenido suele disminuir rápidamente con la profundidad; las excepciones más importantes corresponden a los suelos podsólicos, en los que un horizonte agotado en materia orgánica yace sobre otro horizonte de acumulación de esta materia (horizonte B) y en los paleosuelos, en los que antiguas capas superficiales enriquecidas con materia orgánica quedan enteradas bajo depósitos mas recientes. (36)

Naturaleza química de las sustancias húmicas. La identificación de las materias húmicas encontradas en los suelos minerales, turbas y sedimento ha sido tema de diversos estudios. El método tradicionalmente utilizado en química orgánica, es la división química seguida de identificación de las fracciones ha permitido aislar numerosos componentes, aunque invariablemente, con bajo rendimiento. La oxidación con permanganato libera ácidos grasos, ácidos dicarboxílicos y tricarboxílicos, diferentes ácidos bencénicos y fenólicos. Las materias húmicas pueden degradarse mediante técnicas reductoras con fenol o sulfuro sódico en caliente o por pirólisis.

Las técnicas excesivamente enérgicas utilizadas en la degradación y los escasos productos identificables obtenidos, hacen difícil llegar a conclusiones firmes sobre la estructura original de las sustancias húmicas, si se exceptúa la evidencia de la presencia de cadenas con anillos aromáticos, con frecuencia fuertemente sustituidas.

En general los métodos físicos de análisis han sido más valiosos a la hora de dilucidar la estructura del humus que los procesos de degradación, pero la estructura química de las sustancias húmicas es aún poco conocida. La expresión estructura química de las sustancias húmicas, es probablemente engañosa, por cuanto parece significar que existe una estructura que debe descubrirse cuando, en realidad, se trata de un complejo difícil de establecer.

Es mucho mas exacto señalar que existen numerosas estructuras, generadas por reacciones al azar entre muchas moléculas, en formas totalmente diferentes a como se originan los polímeros en las plantas y animales, donde se elaboran de un modo sistemático por enzimas que actúan mediante control genético.(36)

Extracción de las sustancias húmicas, La mayor parte de las sustancias húmicas se encuentran unidas en diferente forma con la parte mineral del suelo, quedando tan sólo una pequeña fracción en estado libre, por tanto, para pasar a estado soluble es preciso destruir esta unión (14).

La extracción del suelo de las sustancias húmicas se lleva a cabo en la actualidad con el empleo de diversas soluciones. Las sales neutras de los ácidos minerales, en particular el pirofosfato de sodio, al igual que algunas sales neutras de los ácidos orgánicos se utilizan con este fin, con base en la capacidad que tienen para formar precipitados insolubles o complejos solubles con el calcio, hierro, aluminio y otros cationes polivalentes, presentes en el suelo formando a su vez enlaces con las sustancias húmicas. Así, como resultado de dichas reacciones, éstas pasan a estado soluble. Sin embargo, con las soluciones citadas se extrae menos materia orgánica que con soluciones de álcalis (15).

De hecho, la escogencia del extractante tiene la influencia decisiva en los resultados del fraccionamiento, en caso de usarlos en forma selectiva, la secuencia debe estar relacionada con el tipo de unión que se pretende romper. Si uno de los objetos de la investigación es conocer los tipos de uniones existentes entre la materia orgánica y la fracción mineral, se debe usar en forma secuencial los siguientes extractantes.

1. Solución de tetraborato de Sodio (Buffer de Sorensen). Este reactivo distingue enlaces electrostáticos, que son de fácil rompimiento por simple intercambio iónico, de las sustancias órgano-minerales móviles.

2. Solución de pirofosfato de Sodio. Rompe enlaces de coordinación, específicamente, uniones entre la materia orgánica y las arcillas, por hidróxidos y óxidos metálicos, son los denominados complejos inmóviles.
3. Soluciones de hidróxido de Sodio. Destruyen casi todos los enlaces órgano-minerales (16).

La solubilidad que en cierta manera está relacionada con el peso molecular y también el número de grupos ácidos, varía ampliamente. Se ha postulado que en seno de la macromolécula húmica existe una parte hidrófila, asociada a grupos ionizables, así como otra hidrófoba, da carácter aromático. Dependiendo del predominio de cada una de dichas partes, a veces incluso parcialmente separables por hidrólisis, se originan las diferentes solubilidades.

Se suelen separar diferentes fracciones atendiendo a esta solubilidad, de esta manera se obtienen los Ácidos Fúlvicos sometiendo el suelo a extracciones con álcali y posteriormente acidulando hasta un pH próximo a 1.(35) El líquido amarillo rojizo contiene los Ácidos Fúlvicos y el precipitado castaño oscuro o negro, insoluble en dicho medio ácido, constituye la fracción húmica. Todo lo que queda sin extraer se denomina convencionalmente humina.

Los Ácidos Húmicos, en estos se encuentran englobadas las materias que se extraen del suelo por disolventes (NaOH, KOH, NH₄OH, Na₂HCO₃, Na₄P₂O₇, NaF, oxalato sódico, urea, y otros), y que al acidificar con ácidos minerales, se precipitan de las soluciones obtenidas en forma de un gel oscuro (Kononova, 1983).

A pesar de la diversidad de los ácidos húmicos de distintos suelos, turbas, restos vegetales en descomposición, conservan unos principios de estructura muy semejantes, pero tienen una naturaleza muy particular y muy distinta a la de cualquier sustancia vegetal.

Sobre la naturaleza aromática de los ácidos húmicos de suelos y turbas hablan los datos obtenidos con ayuda de espectroscopia infrarroja. En el estudio

comparativo de distintos suelos, los autores registran un mismo tipo de carácter de espectros infrarrojos, lo que puede servir de indicación de la similitud de constitución de estos ácidos (2).

Los grupos funcionales característicos de los ácidos húmicos son los carboxilos e hidroxilos fenólicos, cuyo hidrógeno es susceptible a las reacciones de sustitución. por la presencia de estos grupos se determinan las propiedades ácidas y la capacidad de cambio de los ácidos húmicos, para determinar la cantidad de estos grupos funcionales, debe considerarse la naturaleza de dichos ácidos, así como los métodos empleados en su determinación.

De la experiencia de los investigadores en el dominio de los ácidos Húmicos de carbones fósiles y turbas, se deduce que la relación C:H aumenta en el proceso de formación del carbón y refleja el grado de condensación de las rejillas del carbono aromático en la molécula.

Kumada, indica que a medida que transcurre la "maduración" de los ácidos Húmicos, aumenta el porcentaje de carbono y, al mismo tiempo, disminuye el de hidrógeno y nitrógeno. (2)

Las Huminas se consideran como la fracción más estable, que no puede extraerse con los disolventes clásicos. Son moléculas con un alto peso molecular y están implicadas en el complejo arcillo-húmico y órgano-metálico (Stevenson, 1982). En estas moléculas se encuentran todavía fragmentos de lignina no modificados y polisacáridos provenientes de las plantas, esta humina representa alrededor del 50 % del carbono total de los suelos.

Actualmente se sabe que existen diferentes formas de huminas cuya abundancia relativa está sujeta a diferentes factores que actúan sobre su evolución y que además confieren un carácter diferencial a los distintos tipos de suelos y representan gran interés en la mas reciente clasificación del humus.

La humina de insolubilización producto de un proceso de neoformación fisicoquímica que implica la insolubilización progresiva de precursores solubles de naturaleza fenólica, ha seguido un proceso de formación por vía indirecta, que requiere la presencia de cationes complejados para que los productos solubles (compuestos fenólicos, tánicos, monómeros de lignina) evolucionen a formas complejas insolubles, mediante procesos de polimerización. Las uniones que se establecen entre esta humina y la fracción mineral, son muy resistentes, pero tanto la acción del ditionato de Na (reductor) que compleja y libera la materia orgánica ligada al hierro (humina unida al Fe), como la acción de la mezcla de ácidos HCL-HF, al destruir las arcillas y liberar la materia orgánica, permiten la extracción posterior con NaOH de la humina de insolubilización extraíble (humina unida a la arcilla), quedando un residuo denominado humina de insolubilización no extraíble (humina secuestrada). (29).

Otra forma de humina es la humina microbiana, que si bien es muy pequeña, se sabe que desempeña un papel muy importante en la formación de estructuras estables. Esta fracción se valora a través de los carbohidratos, productos de hidrólisis con H₂SO₄ de una fracción de humina de insolubilización no extraíble, y el método de cuantificación es colorimétrico.(29)

Los Ácidos Fúlvicos fueron llamados en la primera mitad del siglo XIX por Berzelius como la mezcla de ácidos crénico y apocrénico.

Los fulvoácidos, poseen en esencia unidades estructurales similares a las de los ácidos húmicos, se caracterizan por la presencia de una fracción nuclear poco pronunciada (rejillas aromáticas del carbono) con predominio de cadenas laterales lo cual da fundamento para considerarlos como los representantes menos "maduros" del grupo de los ácidos húmicos (2).

Pertenecen al grupo de los ácidos hidroxicarboxílicos, y en la hidrólisis ácida forman sustancias reductoras y furfural. Los fulvácidos tienen alta capacidad

de cambio (hasta 700 meq por 100g de sustancia). Actúan destructivamente sobre los minerales; son propensos a formar compuestos complejos con R_2O_3 que poseen gran movilidad.

La baja "aromatización" de los fulvoácidos se evidencia en los datos de la composición elemental, en la que el porcentaje de carbono es significativamente más bajo y el de hidrógeno supera el de los Ácidos Húmicos.

Las investigaciones realizadas por (1), hablan sobre la transición de los ácidos Húmicos a fulvoácidos y viceversa a causa del cambio de su estado químico coloidal.

Los Ácidos Fúlvicos, al igual que los Húmicos, contienen nitrógeno, al hidrolizarlos con ácido clorhídrico 6N, se encontró que el 20-30 % de su nitrógeno pasa a la solución, demostrando su gran movilidad (13).

La identificación de grupos funcionales en materiales complejos polimerizados, como las sustancias húmicas, no es tarea fácil y los resultados que se obtienen suelen estar influidos, frecuentemente por el método utilizado (36). Los estudios revelan que los Ácidos Fúlvicos son sustancias más pobres en carbono que los ácidos húmicos, y que tanto la acidez total como el contenido en grupos hidroxifenólicos tienden a ser mayores en los Ácidos Fúlvicos que en los Húmicos.

Un Ácido Fúlvico estudiado por Hatcher contenía un grupo carboxílico, o un grupo sustitúete con oxígeno (carbonilo, alcohol o éter) por cada 1.8 átomos de carbono no carboxílico. La mayoría de los grupos carboxílicos están por tanto espacialmente próximos entre sí a otros grupos polares, de manera que la disociación de un grupo influirá en la de sus vecinos. Las curvas de valoración de las sustancias húmicas se interpretan mejor como procedentes de una distribución continua de grupos ácidos funcionales, desde los

carboxílicos (fuertemente ácidos) a los de débil acidez, como los hidroxilicos fenólicos.(36)

Los Ácidos Fúlvicos poseen una relación C/H más baja lo que indica su menor carácter aromático y en consecuencia, su naturaleza alifática predominante. Se trata de polímeros poco condensados y de bajo peso molecular. Existen en variadas proporciones en el humus y en su concentración relativa depende de muchos factores, tales como la edad del humus, su origen y el grado de lixiviación del suelo, entre otros. Hoy es opinión muy generalizada que los Ácidos Fúlvicos, son los representantes menos maduros que los ácidos húmicos.(5)

Purificación de los Ácidos Fúlvicos. Estos Ácidos Fúlvicos presentan grandes dificultades para separar impurezas orgánicas como minerales. Son numerosos los métodos ensayados en diversos tipos de material húmico, a continuación se podrían resumir los más importantes para eliminación de impurezas inorgánicas:

Tratamiento con resinas de cambio, diálisis y electrodiálisis basados en procesos de liofilización, disolución de las cenizas con mezclas ácidas, especialmente con HF-HCl. Respecto a los impurificantes de tipo orgánicos, el problema es aún mas complicado, pues no es fácil determinarlos en las sustancias húmicas, al contrario que las inorgánicas.

Los métodos ya mencionados de diálisis y electrodiálisis son bastante adecuados para Ácidos Húmicos, en cambio para Ácidos Fúlvicos son poco eficaces, porque al mismo tiempo que atraviesan las membranas las sustancias impurificantes, lo hacen muchos compuestos de bajo peso molecular.(30)

Otra técnica es la liofilización, en la cual Hubert, 1971 afirma haber eliminado en gran proporción las cenizas acompañantes de Ácidos Fúlvicos aprovechando la pérdida por parte de la sílice de sus propiedades coloidales en el proceso de secado en frío. Por varios tratamientos alternativos con elusión con resinas de

intercambio, estos autores consiguen rendimiento de purificación realmente notables, especialmente para la sílice que llega a disminuir cerca de 40 veces (33).

Otra alternativa de purificación de Ácidos Fúlvicos consiste en realizar primero una disolución de las mismas con metanol, luego pasarlos a través de una columna Dowex 50 H⁺ y lavarlos a 40 °C con rotaevaporación.

Los métodos que se basan en el uso de resinas, especialmente de intercambio iónico, suelen ser relativamente eficaces para Ácidos Fúlvicos por ser solubles en medio ácido, apenas son retenidos durante la percolación en columnas. Schnitzer, hace el intercambio de los Ácidos Fúlvicos en columnas de amberlita IR-120 de intercambio catiónico en forma protónica obteniendo buenos resultados.

El uso de las resinas de intercambio se basa en fenómenos de intercambio que han sido observados desde hace mucho tiempo, pero solo hasta 1935, Adams y Colmes sintetizaron y utilizaron resinas intercambiadoras de cationes del tipo fenol-formaldehído y en 1944 empezó la era moderna de las resinas intercambiadoras de iones con matriz de polietileno, sintetizadas por D'Allelio. Un intercambiador iónico consiste en una matriz insoluble, a la cual se han ligado covalentemente grupos cargados. Los grupos cargados están asociados a contraiones móviles, que pueden ser intercambiados reversiblemente con iones de igual carga, sin alterar la matriz. La unión del contraión al intercambiador es debida a fuerzas electrostáticas entre ellos. La iniciarse el proceso, las cargas del intercambiador están balanceadas por contraiones con otro ión de igual carga, de tal forma que el proceso total en una zona dada es eléctricamente neutro.

A pesar de que los materiales naturales son intercambiadores iónicos, actualmente se utilizan materiales sintéticos como matriz, ya que presentan mayor capacidad, estabilidad química, mecánica y térmica frente a oxidantes.

Entre las matrices más utilizadas se encuentran las resinas de poliestireno, resinas de tipo fenol-formaldehído, celulosa, sacarosa y dextrano. La naturaleza de la matriz determina las propiedades físicas del intercambiador (velocidad de flujo, hinchamiento, etc).

Además de las resinas de intercambio, estudios recientes como muestran el uso de resinas de adsorción como son las Amberlita XAD-2,7,8 y 16 (polimetilmetacrilato), y las columnas de polivinilpirolidina (PVP) insoluble.(9, 10, 18). Con estas resinas se adsorben los extractos fúlvicos sobre estas resinas, y se considera que los materiales coloreados que se retienen a pH ácidos son principalmente de naturaleza aromática. Estas fracciones son eluidas con NaOH 0.1M y pasadas a través de una columna de intercambio como la de Amberlita IR-120.(9, 39, 18), esta metodología es además la sugerida por la Ciencia del Suelo.

Las resinas de Adsorción Amberlita son constituidas por un adsorbente polimérico suministrado en forma de esferas blancas insolubles. Es un material no iónico, hidrofóbico, constituido por un polímero de enlaces cruzados de los cuales se derivan sus propiedades adsorptivas (contiene tanto una fase de polímero continuo y una fase porosa continua) Poseen una alta área de superficie y su naturaleza es aromática. Tiene alta resistencia física, características hidráulicas y estabilidad térmica, tiene bajo crecimiento entre solventes y medios acuosos. El adsorbente polimérico XAD-16 es producido para adsorber moléculas hidrofóbicas de solventes polares y componentes orgánicos polares de flujos de vapor. Su característica distribución de tamaño de poros hace de la amberlita una excelente opción para la adsorción de sustancias orgánicas de relativamente bajos a medianos pesos moléculas. Puede ser utilizada en columnas.

Entre las propiedades de la resina se tiene que poseen una matriz de polímero aromático de enlaces cruzados macroreticulados, sus formas físicas en esferas blancas, su capacidad de mantenimiento de humedad 62-70%, su gravedad

específica 1.015 a 1.025, su tamaño armónico promedio 5.60 a 7.10 micrómetros, su área de superficie > 800m²/g y su porosidad >0.55mL/mL.

Caracterización de las sustancias húmicas. Las metodologías que a continuación se indican, son las utilizadas para establecer características físico-químicas de los materiales húmicos (18).

Los métodos más usados son: El análisis de composición elemental CHN y de grupos funcionales, como es el análisis de acidez total, grupos COOH, grupos OH fenólicos y alcohólicos, grupos cetónicos y grupos de quinonas, contenido de compuestos aromáticos y cíclicos. Además son utilizados para caracterizar los métodos cromatográficos como cromatografía de papel, de gases y de gel (sephadex), electroforesis sobre papel y sobre gel.

La determinación de las propiedades ópticas de ha determinado por espectroscopia infrarroja y análisis IRTF en uno 3202 con condiciones de reflectancia difusa, donde se utiliza la función de Kubelka mulk como función matemática para la medición y conseguir el espectro donde la intensidad de las bandas varía linealmente con la concentración de la muestra en la matriz.

También se utiliza la técnica de espectroscopia en la región visible, la cual ha sido utilizada ampliamente en la química de los suelos para tal fin. Basándose en esta técnica se ha definido la relación E_4/E_6 , que es el cociente de las absorbancias de soluciones diluidas de AH o AF a 465 y 665 nm., esto con el propósito de determinar el grado de polimerización y condensación de los Ácidos Fúlvicos.

Otros métodos son la espectrometría de masas, resonancia de spin electrón, Resonancia Magnética Nuclear de Carbono ¹³ y sus combinaciones con los cuales se analiza la relación entre el coeficiente de partición y las propiedades estructurales y composicionales de los Ácidos Fúlvicos.

Cualquiera de estas técnicas requiere una purificación previa que permita eliminar totalmente los reactivos de extracción, los constituyentes minerales ligados o asociados a moléculas húmicas e impurezas orgánicas como los carbohidratos y proteínas (19).

Algunas características de los suelos a trabajar.

Oxisoles. La mayoría de los Oxisoles están confinados a las regiones intertropicales y a superficies geológicas antiguas y estables. En América tropical, estos suelos dominan en la superficie de los escudos continentales de Guyana y Brasil y en la mitad oriental del Valle amazónico, formado a partir de sedimentos fuertemente intemperizados de textura gruesa.

Son suelos muy antiguos o formados a partir de sedimentos previamente meteorizados. Se caracterizan por un grado de meteorización extrema, por lo cual presentan una fuerte acidez y han perdido casi toda la capacidad para suplir nutrimentos a las plantas. Su fracción mineral se compone casi exclusivamente de caolinita (arcilla 1:1 pobre en sílice), sesquióxidos y óxidos libres de Fe y Al y los productos más resistentes a la meteorización, principalmente cuarzo residual. Estas características alcanzan su máxima expresión en el horizonte óxico, el cual es su propiedad de diagnóstico más importante.

Dentro de las características que definen un horizonte óxico se tiene que poseen un espesor de 30cm o más, posee fracción de partículas finas (menor de 2mm), su C.I.C. es menor de 16 mequ/100g de arcilla, por el método de NH_4Oac 1N a pH 7., el contenido de silicatos meteorizables (feldespatos, micas vidrios volcánicos y minerales ferromagnesianos) es menor que un 3% en la fracción entre 20 y 200 micrones, si hay moscovita presente, su contenido es menor que un 6%, más de un 15% de arcilla y textura franco arenosa o más fina, y poseen menos de un 5% en volumen de estructura de roca (saprolita).

El color característico de los oxisoles varia desde amarillo o pardo claro hasta rojo oscuro. La coloración en estos suelos se debe principalmente a sus altos contenidos de óxidos de hierro, el color está determinado tanto por el tipo de óxido de hierro dominante, como por su abundancia relativa. El contenido de hierro aumenta generalmente a medida que disminuye el tamaño de las partículas en la fracción fina (<50um) del suelo.

Sus texturas predominantes varían de francas a arcillosas, debido a la intensa meteorización física.

Además de las arcillas (básicamente caolinita), estos suelos contienen cantidades apreciables de óxidos de hierro en varios grados de hidratación y cristalización, asociados con óxidos de aluminio.

Los Oxisoles son suelos bien drenados, con altas tasas de infiltración y permeabilidad y como consecuencia se produce una precolación considerable en estos suelos.

La mayoría de los oxisoles tienen contenidos de materia orgánica similares a los de otros suelos menos meteorizados y más fértiles, contrariamente a lo que sugiere su color, el valor de este contenido varía entre 2 y 4 %.

El contenido de materia orgánica está directamente relacionado con el tipo de vegetación existente en las diferentes regiones, el cual está determinado por el balance hídrico de cada región. El contenido de materia orgánica se establece por el balance entre las adiciones de materia orgánica fresca y de las tasas de descomposición.(29)

Los andisoles colombianos están ampliamente distribuidos en la región andina del país, especialmente en la cordillera central, en las cordilleras occidental y oriental también se presentan pero, comparativamente con la central, en menor proporción.

Los suelos de Ando, referidos como suelos oscuros por los japoneses, fueron introducidos a la nomenclatura pedológica por Thorp y Smith 1949 como suelos desarrollados a partir de una amplia gama de depósitos de cenizas volcánicas en las islas japonesas, en Filipinas, Hawai y casi con certeza en otras islas del pacífico, África y América central. Estos suelos, fundamentalmente consisten en un horizonte A pardo oscuro a negro, de 30 cm aproximadamente de espesor, estructura grumosa y granular fina, con un contenido de materiales orgánicos hasta del 30 % en los miembros más oscuros del grupo.(9)

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

El intemperismo y la transformación mineral, son los procesos dominantes en los andisoles, las translocaciones y acumulaciones de los compuestos translocados generalmente son mínimos, sin embargo puede producirse migración de la materia orgánica complejada con aluminio, bajo condiciones determinadas por la naturaleza de las sustancias húmicas y del componente mineral.

La fracción coloidal está constituida especialmente por minerales con bajo grado de ordenamiento cristalino y por complejos humus-aluminio lo cual determina sus propiedades físico-químicas y biológicas.

El pH es fuertemente tamponado entre 4 y 5 debido a la alta cantidad de aluminio precipitado, su alta capacidad de intercambio catiónico es

especialmente dependiente del pH, poseen alta capacidad para fijar fosfatos y nitratos debido a su carga aniónica.

El horizonte A es de color negro (melánico), de consistencia friable, con muy baja densidad aparente, 0.9 y desciende a 0.5 en suelos hidromorfos, tiene alta capacidad de retención de agua, alto índice de plasticidad (tixopría) alta superficie específica, reportándose valores de 400 m/g. En andisoles más evolucionados, la proporción de arenas es baja y generalmente corresponden a vidrios no o poco alterados. Estos suelos presentan estructura granular en agregados finos del tamaño de los limos, denominados pseudolimos.

En cuanto al componente orgánico los Andisoles se caracterizan por su alto contenido de carbono total, la relación C/N es variable entre 14 y 48 dependiendo, en la superficie, de la composición de los residuos orgánicos provenientes de la vegetación que sustentan, y en los horizontes profundos depende de la edad de los compuestos.

Los Andisoles son ricos en materia orgánica humificada la cual es en su mayor parte extractable con reactivos alcalinos corrientes. Los compuestos extractables AF y AH proviene de la insolubilización de precursores solubles, las fracciones fuertemente policondensadas denominadas ácidos Húmicos grises, son escasas.

Una de las propiedades sobresalientes de los Andisoles es su alta capacidad de fijación de Fósforo (1). La producción adecuada de cultivos obliga a la aplicación de dosis altas de Fósforo para sobreponer el alto poder de fijación y permitir un adecuado suplemento de este nutriente. La aplicación sucesiva de dosis altas de Fósforo permite pensar en la posibilidad de saturar la demanda de fijación de Fósforo y esperar efectos residuales que beneficien a cultivos posteriores. (9)

5. MATERIALES Y METODOS

5.1 MATERIALES

Para el desarrollo del proyecto se utilizaron los horizontes llamados Horizonte A (HA) y Horizonte B (HB) de dos suelos Colombianos, un Andisol proveniente del Cauca y un Oxisol de la Amazonía.(tamizados y secados en invernadero).

5.1.1. Andisol

Localización geográfica: Departamento del Cauca, municipio de Cajibío, vereda La Aurelia

Posición Geomorfológico: Planicie disectada, meseta de Popayán

Temperatura promedio: 19 °C

Altura sobre el nivel del mar: 1740 metros

Clima: Templado

Precipitación Lluviosa Anual: 1500mm

Relieve: Ligeramente ondulado

Pendiente: 7-12%.

Material Parental: Cenizas Volcánicas

Profundidad Efectiva: Muy efectiva

Nivel Freático: Muy profundo

renaje: Natural moderado

Fertilidad: Regular

Cultivo actual: Potrero (grama)

Cultivo futuro: Café

Taxonomía: Acrudoxic Melanodans

5.1.2. Oxisol

Localización Geográfica: Departamento del Amazonas, municipio de Leticia, finca Belfa

Posición Geomorfológico: Lomerio

Clima: Cálido

Temperatura promedio: 28 °C

Precipitación Lluviosa anual: 4000mm

Relieve: Ligeramente plano

Pendiente: 1-3%

Material Parental: Arcillas del terciario superior amazónico

Profundidad Efectiva: Superficial

Nivel Freático: Mas de 150 cm de profundidad

Drenaje: Interno, rápido, externo, medio, natural, bien drenado

Cultivo actual: Bosque primario

Cultivo futuro: Café

Taxonomía: Typic Haploperox

5.2. ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LOS SUELOS.

Con el objeto de caracterizar los dos tipos de suelos se utilizaron las siguientes metodologías

5.2.1 Análisis Físicos

Humedad. Se pesó el suelo en una cápsula tarada previamente y se introdujo en estufa por 24 horas a 105 ° C. La diferencia de pesos determina la humedad del suelo.

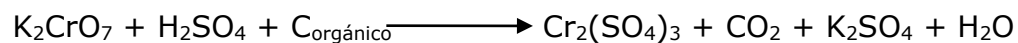
Textura. Método hidrométrico de Bouyoucos, donde se midió la densidad de la muestra en agua, con un hidrómetro a diferentes tiempos: la primera se

tomó a los 40 segundos de preparada la suspensión, tiempo en el cual se han sedimentado las arenas, midiéndose la densidad de limos mas arcillas. Luego se tomó otra lectura a las 2 horas, tiempo en el cual se ha sedimentado los limos, quedando en suspensión las arcillas, midiéndose la densidad de ellas.

5.2.2 Análisis Químicos

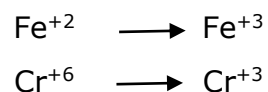
pH. Método Potenciométrico, donde se realizó la determinación del pH con un electrodo de vidrio, teniendo en cuenta una relación agua suelo de 1:1.

Carbono Orgánico. Se utilizó el método Walkley Black, el cual consiste en oxidar el carbono orgánico presente en el suelo con un oxidante en medio ácido, utilizando como oxidante K_2CrO_7 1N y como medio, ácido sulfúrico concentrado. La reacción que ocurre es la siguiente



En este método la oxidación del carbono orgánico no es total, se logra un rendimiento del 77 % y por eso se llama carbono orgánico más fácilmente oxidable. El resto sería carbón grafito o carbón vegetal que no es fácilmente oxidable.

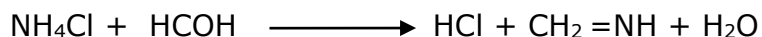
Como quedó materia orgánica que no se oxida y K_2CrO_7 que sobró después de la reacción entonces se valoró volumétricamente lo que queda de K_2CrO_7 con una solución de sulfato ferroso amónico, utilizando un blanco que conste de solución de K_2CrO_7 1N con H_2SO_4 . Las reacciones que ocurren en este paso serían:



En ambas titulaciones se utilizó como indicador difenilamina.

Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC). Consistió en sacar todos los cationes que tenga el suelo y reemplazarlos por otro catión, en este caso NH_4^+ ,

el suelo seco, tamizado y muy fino, se satura con NH_4^+ tratando de llevar la saturación al máximo y de que sea estable. Luego se desplazó el NH_4^+ adsorbido con NaCl , obteniéndose NH_4Cl en solución que se trató con formaldehído neutro y el HCl obtenido se tituló con NaOH 0.1N. La reacción que ocurre es la siguiente:



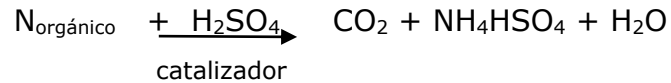
Bases Intercambiables. Calcio, Magnesio, Sodio y Potasio. Se utilizó el primer extracto del tratamiento con AcONH_4 1N de la determinación de CIC y la cuantificación se realizó por espectrofotometría de Absorción Atómica

Acidez total. Se realizó una extracción de todos los cationes del suelo con una solución KCl 1N, de tal manera que se produjo un desplazamiento de todos los iones presentes en el suelo, liberando así los iones H^+ provenientes de grupos carboxilo y fenólicos, los cuales fueron titulados con NaOH 0.1N.

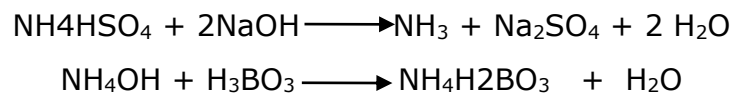
Fósforo disponible. Se utilizó el método Bray II, adecuado para suelos ácidos el cual consistió en una extracción con NH_4F 0.05/ HCl 0.1N., donde el ion fluoruro precipita el calcio soluble por lo que se extrae las formas P-Ca más solubles a pH ácidos También compleja el Aluminio por lo que este extractante es específico para el CaHPO_4 que es soluble a pH ácido. Una vez extraído el Fósforo se procedió a su determinación por el método colorimétrico, el cual consiste en formar un complejo del Fósforo con el ácido Molibdico, que absorbe a cierta longitud de onda.

Hierro, Manganeso, Zinc y Cobre. Se realizó una extracción de estos micronutrientes del suelo con solución de Lindsay y Norvell, DTPA 0.006M, tamponado a pH 7.3 con trietanolamina (TEA) y HCl , y la determinación se realizó por espectrofotometría de Absorción Atómica.

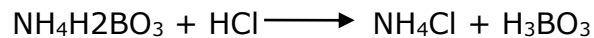
Nitrógeno total. Se siguió el método Kjeldhal, en el cual se realizó una oxidación con ácido sulfúrico, convirtiendo el nitrógeno en sulfato ácido de amonio.



El sulfato ácido de amonio se descompone por medio de un exceso álcali para liberar el amoniaco el cual se recogió por destilación sobre ácido bórico.



El borato de amonio se valoró con HCl o H₂SO₄



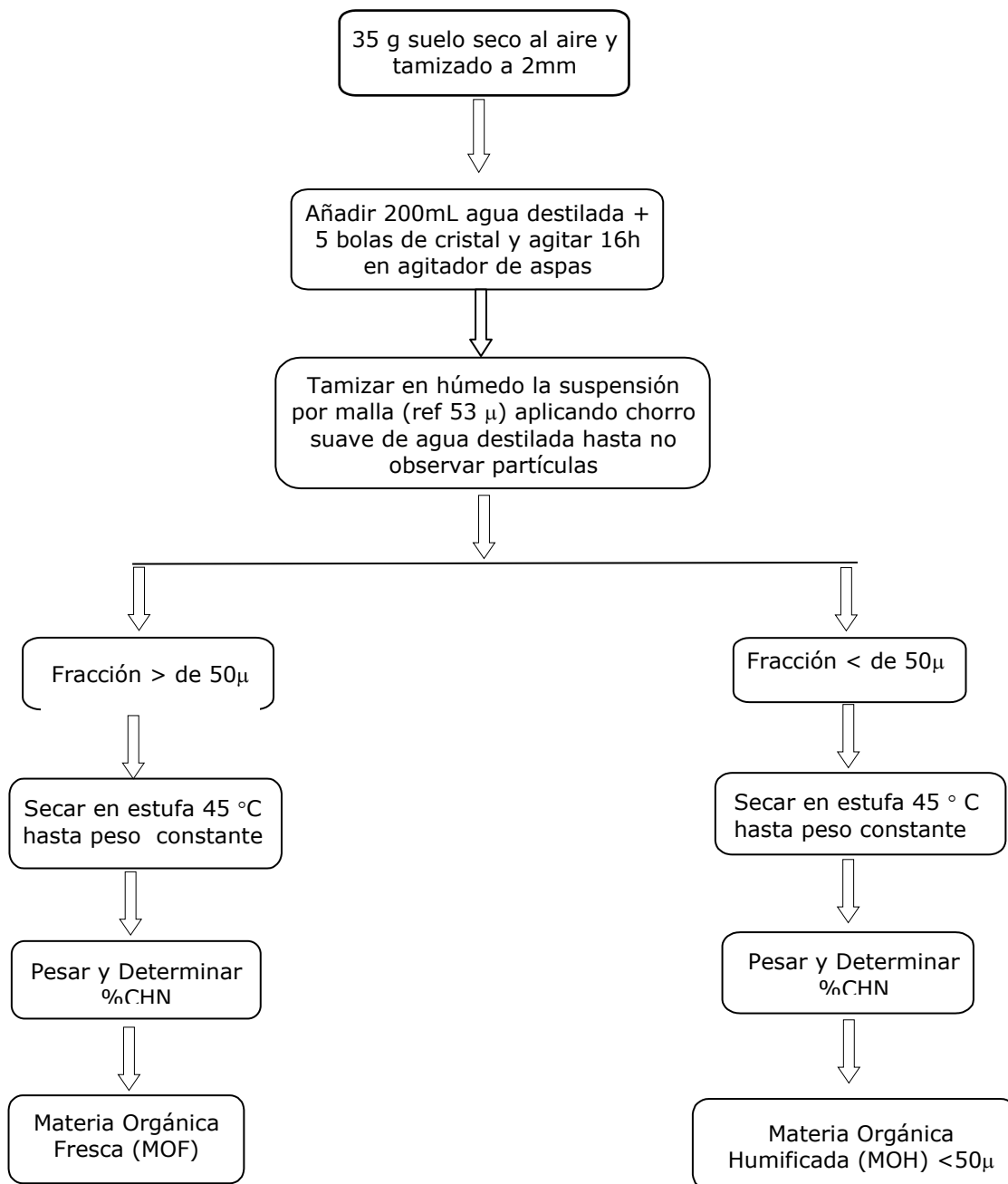
5.3. SEPARACION DE LA MATERIA ORGANICA FRESCA (MOF) Y MATERIA ORGANICA HUMIFICADA (MOH)

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

5.3.1 Método granulométrico

Con este procedimiento se obtuvo la fracción menor de 50 μ, que correspondió a la materia orgánica humificada y la mayor de 50μ a la materia orgánica libre. En el esquema 1 se muestra el procedimiento realizado.

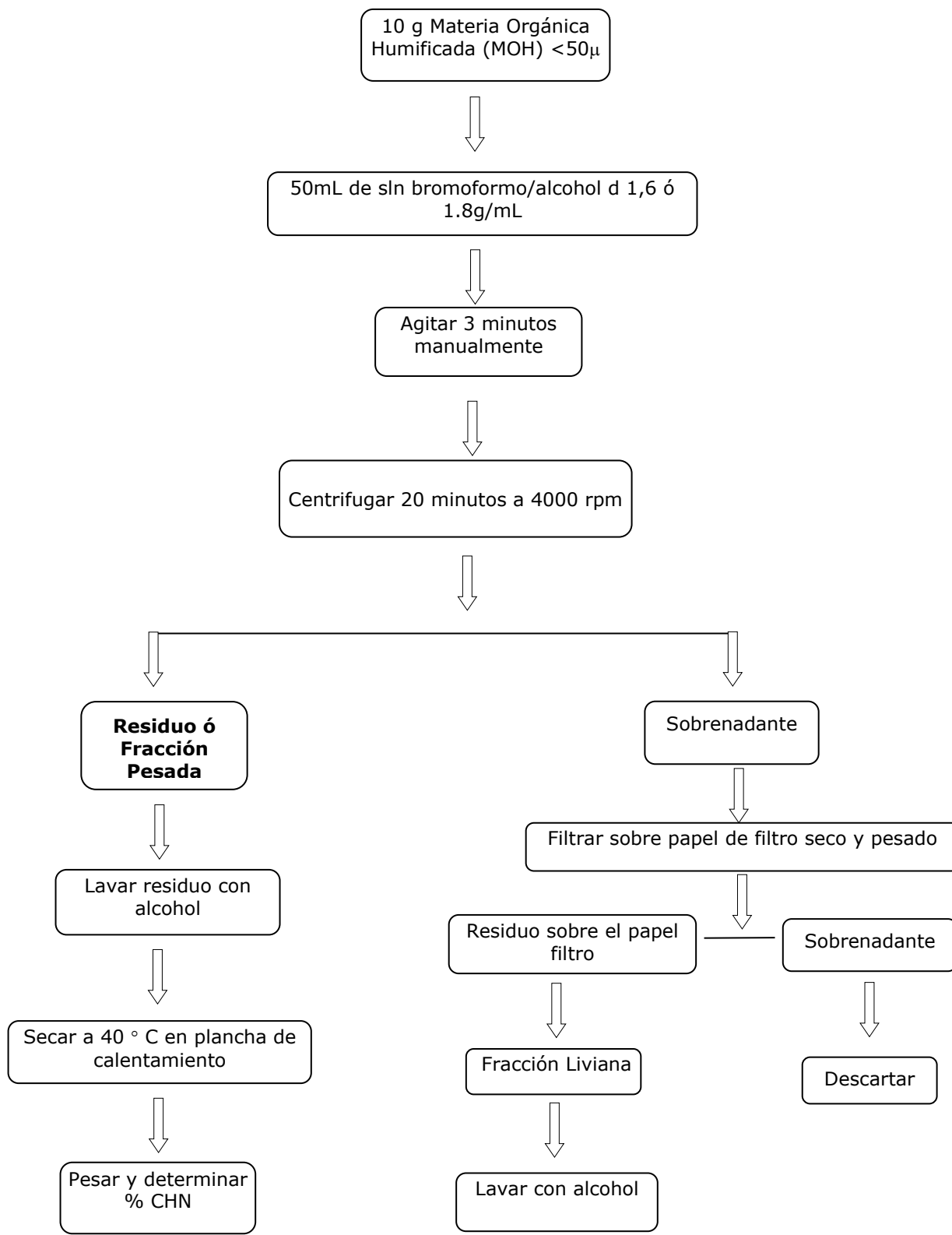
Esquema 1. Separación Granulométrica.



5.3.2 Método Densimétrico

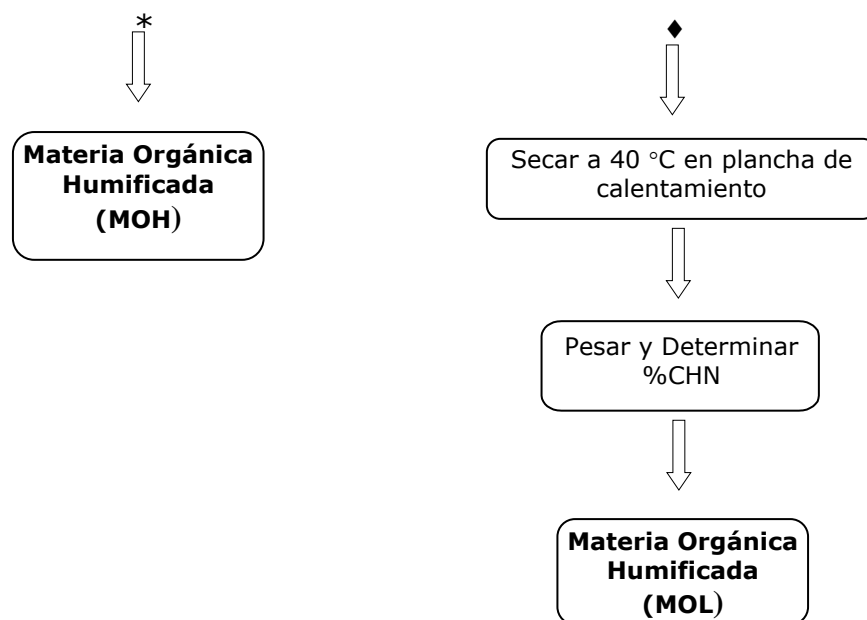
Se utilizó una solución de bromoformo-etanol para completar la separación entre la materia orgánica libre (MOL) y la materia orgánica humificada (MOH), como se muestra en el esquema 2.

Esquema 2. Separación Densimétrica



*

◆



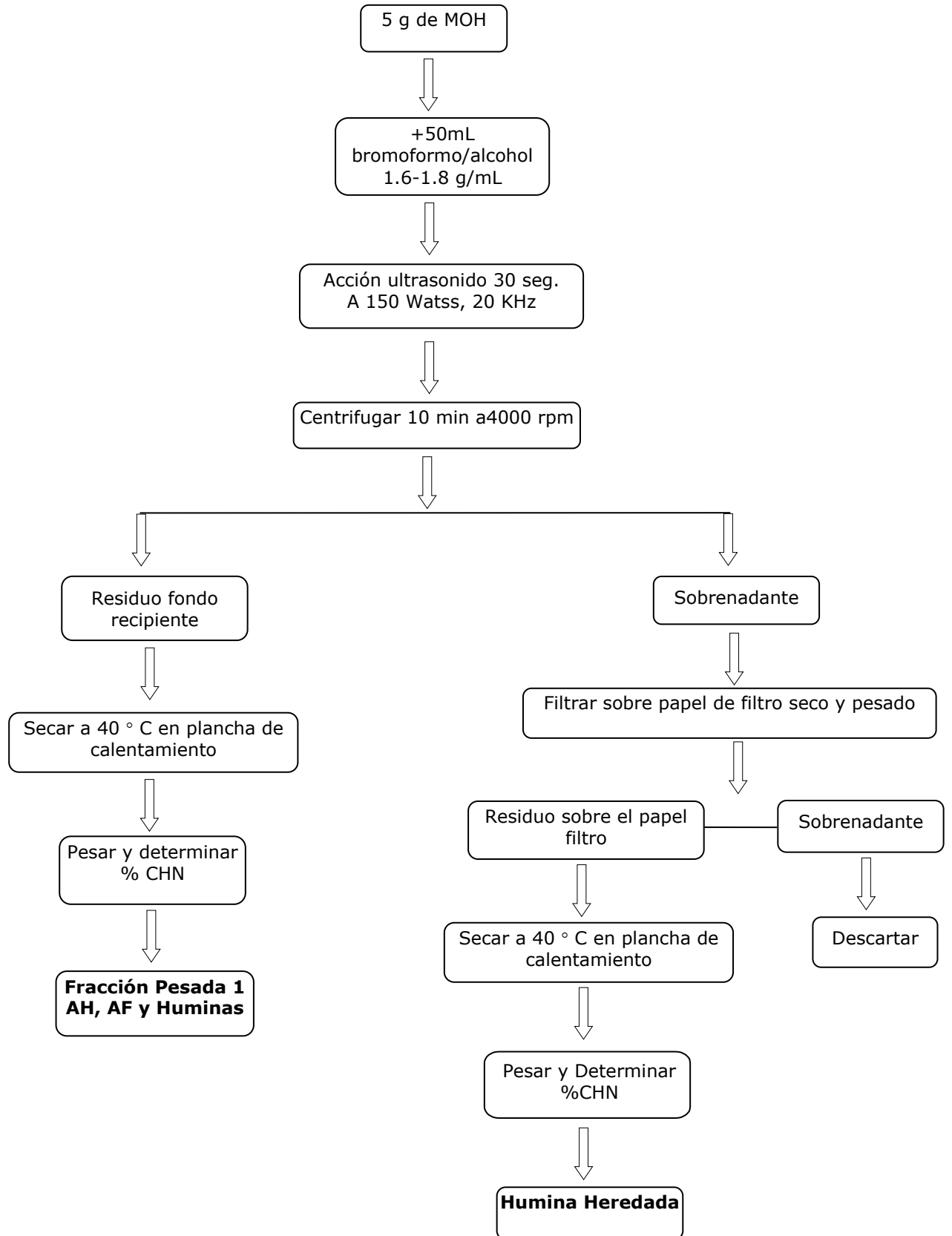
5.4 EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS

En esta etapa se inició la caracterización de la materia orgánica propiamente dicha, o sea la materia orgánica humificada, que comprende los diversos tipos de huminas, ácidos fúlvicos y ácidos húmicos.

5.4.1. Extracción de la Humina Heredada

Inicialmente se separó la Humina Heredada sometiendo la Materia Orgánica Humificada a la acción de una mezcla bromoformo-etanol y ultrasonidos con el fin de romper las uniones lábiles entre la Materia Orgánica y el material inorgánico, como se muestra en el esquema 3.

Esquema 3. Extracción de la Humina Heredada

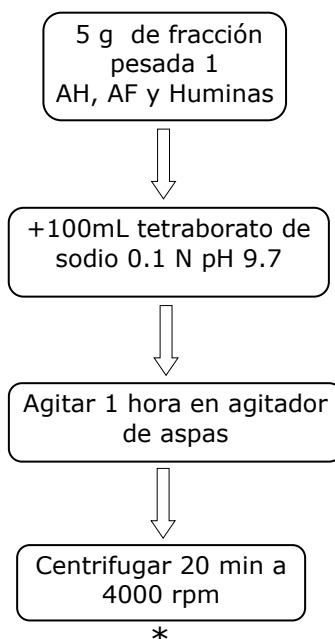


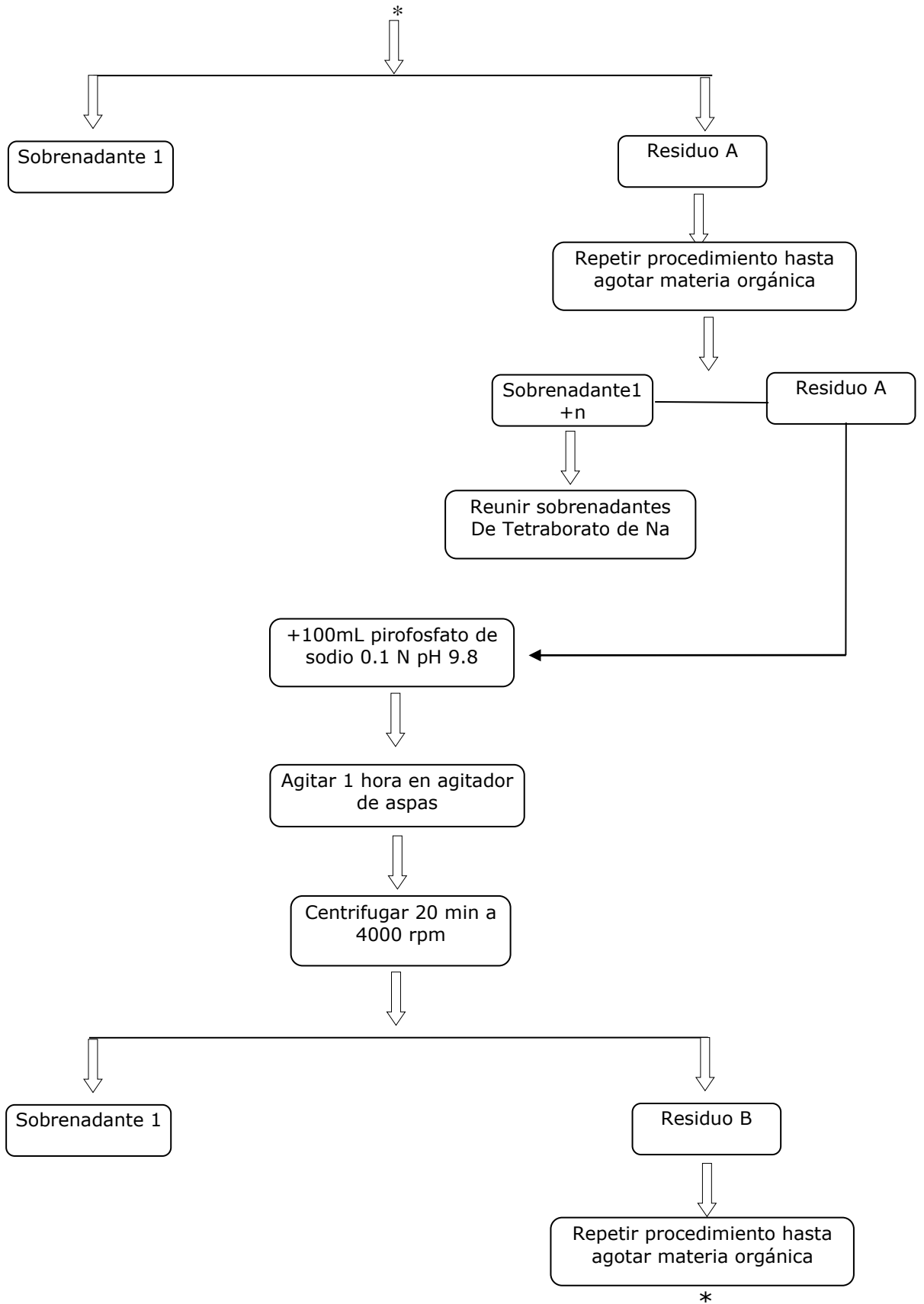
5.4.2 Extracción de Huminas, Ácidos Húmicos y Ácidos Fúlvicos.

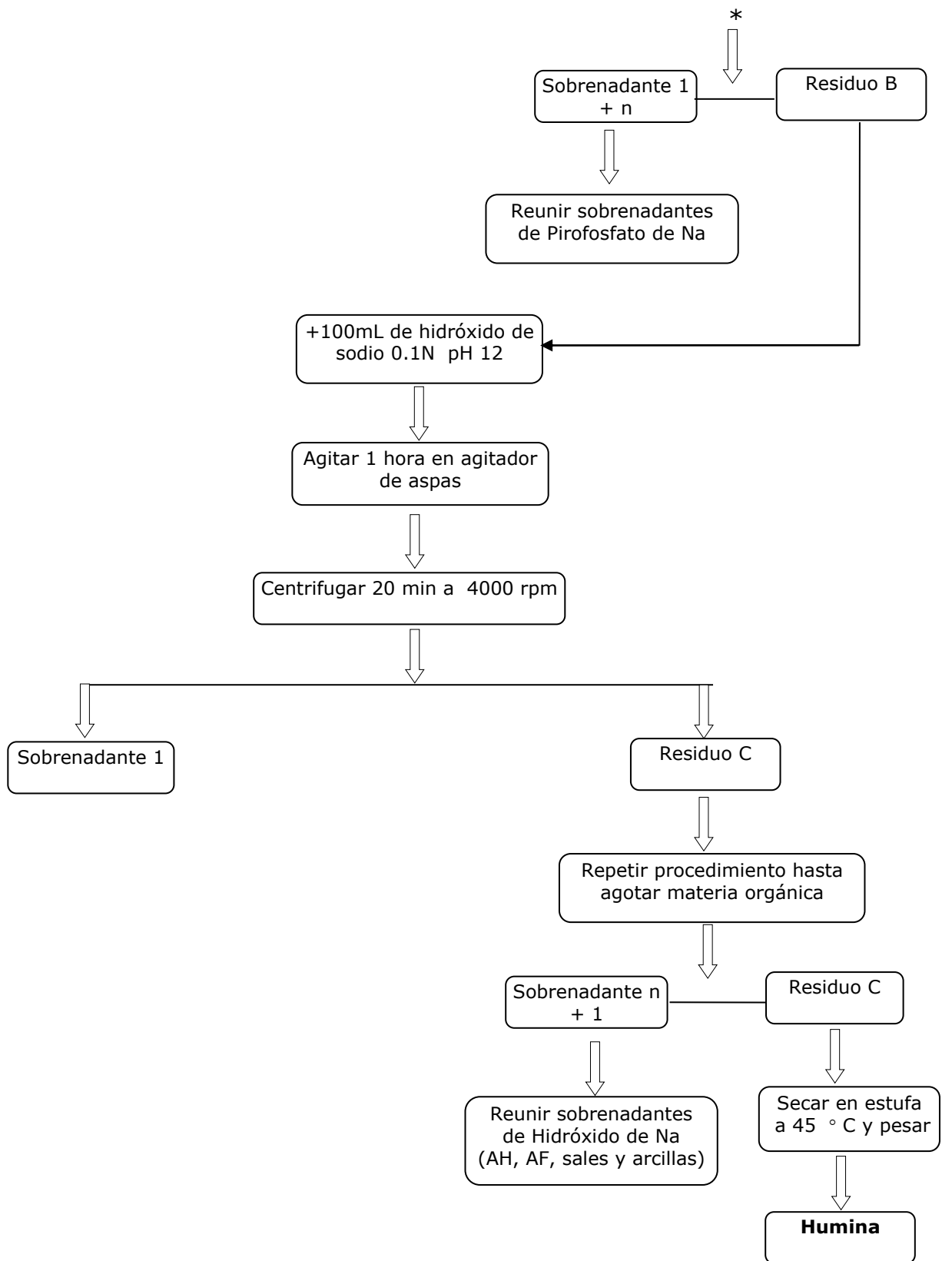
5.4.2.1 Extracción de la Humina. Se partió de la materia orgánica humificada (M.O.H.) a la cual previamente se le había extraído la humina heredada. Se siguió el método sugerido por Barragán (17) en el que se realiza una extracción alcalina sucesiva, con la cual se solubilizan Ácidos Húmicos, Ácidos Fúlvicos y algunas sales y arcillas y quedan insolubles las Huminas. Esto se realizó por separado con tetraborato de sodio 0.1N, con el fin de romper enlaces electrostáticos por simple intercambio iónico, es decir afectando las sustancias organominerales móviles; en segundo lugar se utilizó pirofosfato de sodio 0.1N, el cual actúa sobre los enlaces de coordinación, entre la materia orgánica y las arcillas con lo que se afectan los complejos inmóviles; y por último hidróxido de sodio 0.1N con el cual se destruyen el resto de los enlaces organominerales. De esta manera se obtuvieron los respectivos sobrenadantes de tres soluciones diferentes donde se encontraron ácidos fúlvicos y los ácidos húmicos y además la fracción insoluble denominada humina.

El procedimiento realizado se muestra en el esquema 4.

Esquema 4. Extracción de la Humina

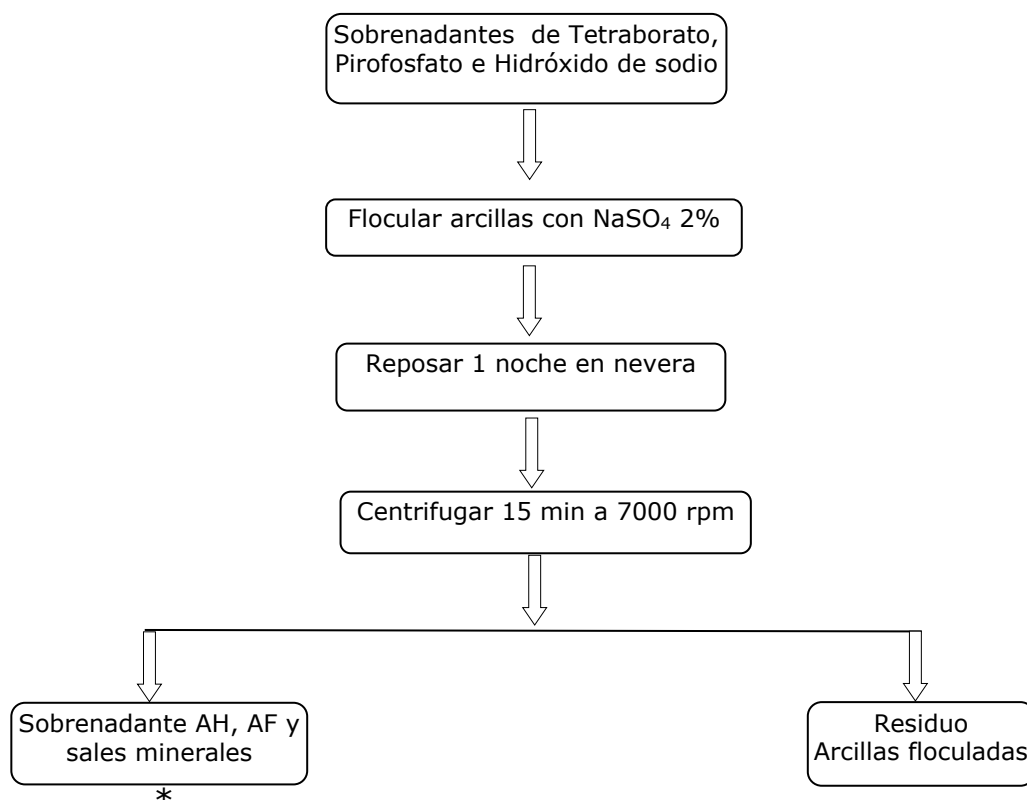


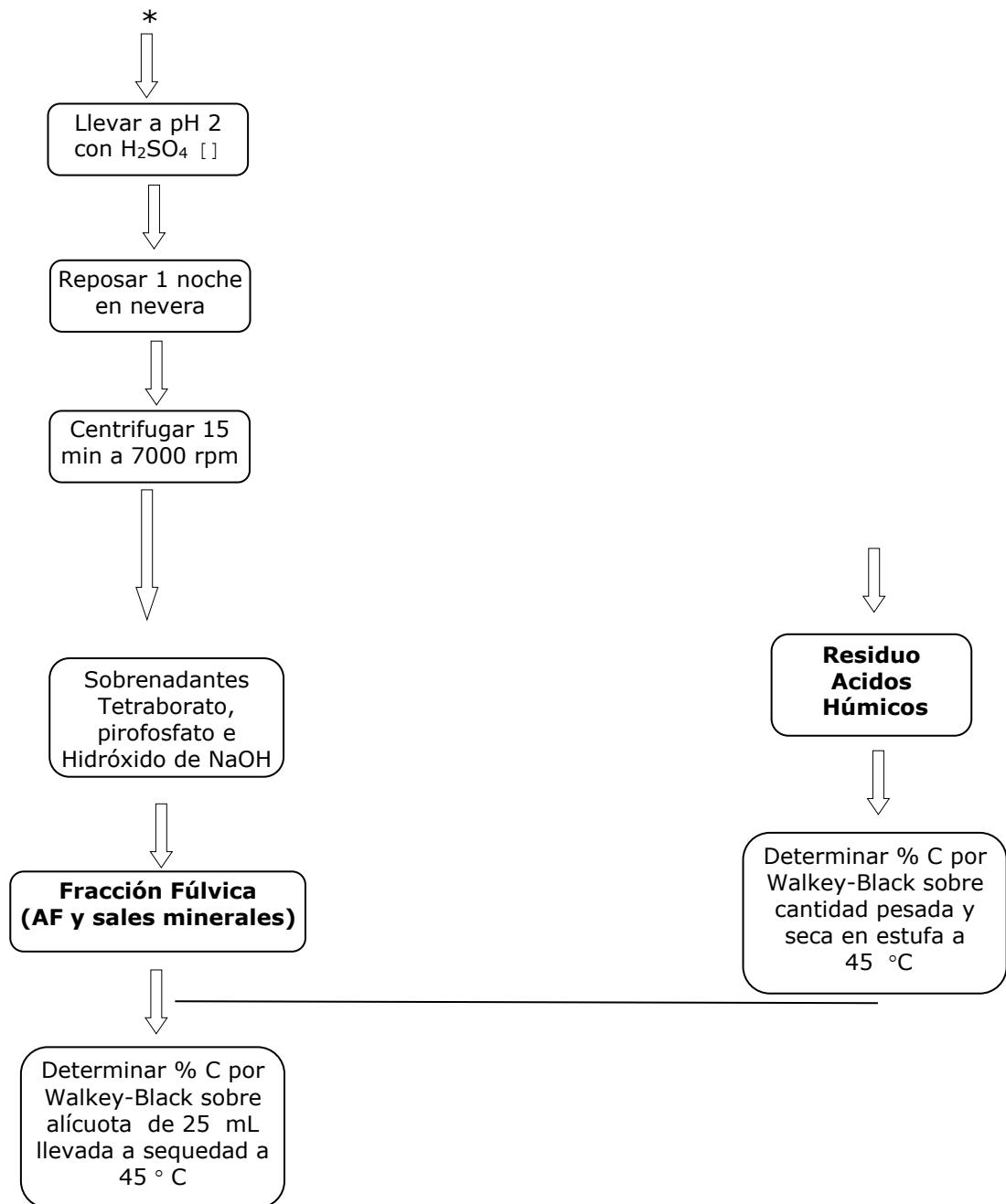




5.4.2.2. Separación de los Ácidos Fúlvicos y los Ácidos Húmicos (Fracción denominada Carbón Extractable). Los sobrenadantes de las extracciones alcalinas contienen AH, AF, sales y arcillas de tamaño pequeño. La primera parte de este proceso empezó con la eliminación de las arcillas con Na_2SO_4 al 2 %, al flocularlas se sedimentan y por centrifugación a 7000 rpm son separadas. Como se muestra en el esquema 5, en el sobrenadante quedan los Ácidos Húmicos (AH), Ácidos Fúlvicos (AF) y sales minerales. La segunda parte es la separación de los AF de los AH, realizándose a partir de los sobrenadantes obtenidos. Estos sobrenadantes se llevaron los cuales se llevan a pH 2 con ácido sulfúrico concentrado, para precipitar los ácidos húmicos que son insolubles en medio ácido. Posteriormente se procedió a su separación, centrifugando a 7000 rpm, donde se obtuvo un sobrenadante que contiene los ácidos fúlvicos y sales minerales y un residuo que fueron los ácidos húmicos.

Esquema 5. Separación de los Ácidos Fúlvicos y los Ácidos Húmicos.





5.5 PURIFICACION DE LOS ÁCIDOS FULVICOS

A los sobrenadantes que contienen los Ácidos Fúlvicos y sales minerales se les denomina Fracción Fúlvica.

5.5.1 Eliminación de sales de la Fracción Fúlvica.

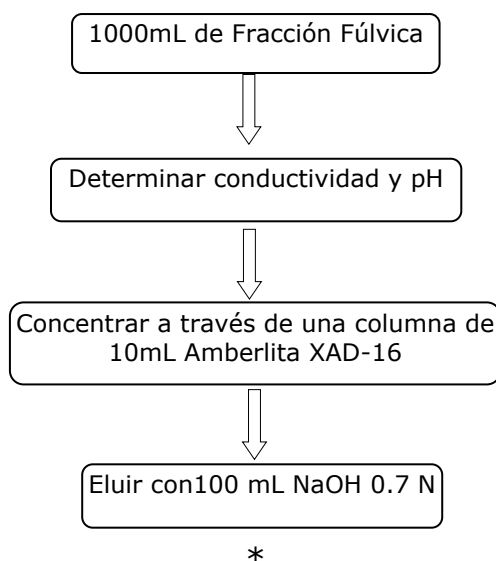
Con el objeto de purificar los Ácidos Fúlvicos, se deben eliminar primero las sales presentes en las Fracción Fúlvica.

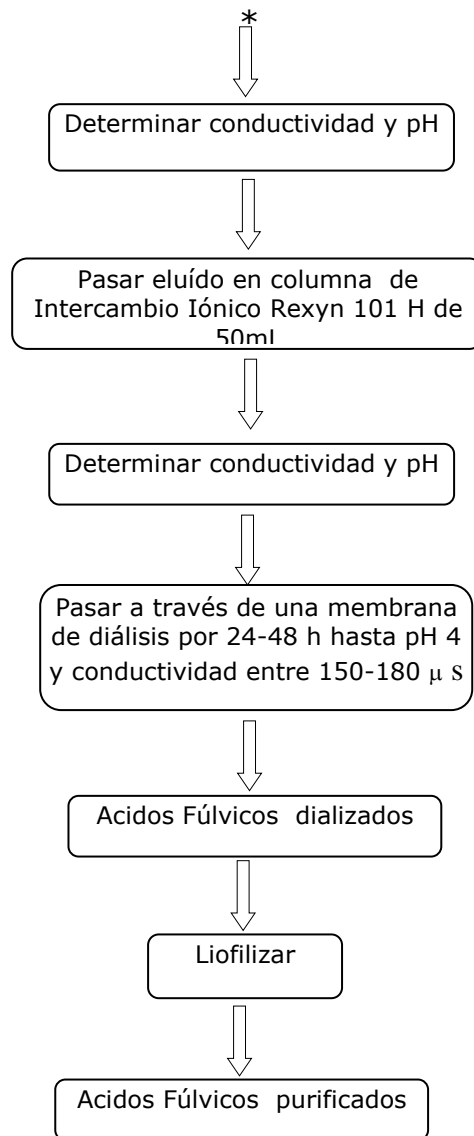
Para eliminar estas sales se utilizó inicialmente una resina de adsorción Amberlita XDA-16, que adsorbe moléculas de bajo a mediano peso molecular como los Ácidos Fúlvicos (AF) y elimina las sales provenientes de los extractantes. Para la recuperación de los Ácidos Fúlvicos, se eluyó con NaOH 0.7 N, obteniendo los AF en forma de sales de NaOH. Posteriormente se pasó esta solución de AF por una resina de Intercambio catiónico como la Rexyn 101 con grupos activos RSO_3^- , que eliminó la mayor parte de Na^+ intercambiándolo por iones H^+ .

Como la purificación no es completa, pues aun quedan sales, los AF obtenidos fueron sometidos a una diálisis por 24-48 horas, utilizando membranas de celulosa con tamaño de poro de 3500 daltons.

Con los ácidos fúlvicos ya purificados, se procedió a liofilizar las muestras con el fin de obtenerlos en estado sólido para su caracterización posterior, todo este procedimiento se muestra en el esquema 6.

Esquema 6. Eliminación de sales de la Fracción Fúlvica





5.5.2 Determinación de la efectividad de la purificación de los Ácidos Fúlvicos.

Con el propósito de comprobar si los Acidos Fúlvicos fueron purificados se procedió primero a realizar el análisis de microscopía petrográfica.

5.5.2.1. Análisis de Microscopía Petrográfica. Este método consistió en tomar imágenes microscópicas con nicols cruzados, utilizando como medio dispersante solución de Salicilato de Metilo con índice de refracción de 1.54.

Esto se observó con un aumento de 4 x 3.3. Este procedimiento se realizó en un equipo Analizador de Imágenes Olympus Bx60.

Aquí se comparó la efectividad de las metodologías empleadas como resinas de intercambio y membranas de diálisis, tomando imágenes provenientes de muestras de ambas metodologías.

5.5.2.2. Análisis IR. Se tomó el espectro IR de muestras de Ácidos Fúlvicos provenientes de las dos metodologías utilizadas para verificar la eliminación de las impurezas de los Ácidos Fúlvicos.

5.6 CARACTERIZACION DE LOS ACIDOS FULVICOS.

Con el objeto de caracterizar los Ácidos Fúlvicos purificados se realizaron los siguientes análisis.

5.6.1 Análisis Elemental.

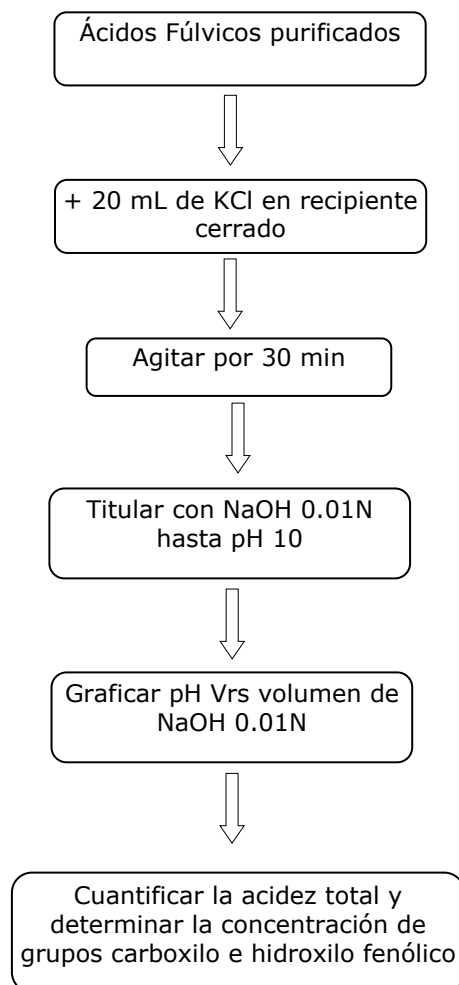
Con el uso del equipo Leco-1000 se determinó el contenido porcentual de los elementos Carbono, Hidrógeno y Nitrógeno en los Ácidos Fúlvicos debidamente liofilizados, para examinar el grado de condensación de estas sustancias húmicas.

5.6.2. Determinación de Acidez Total.

Se realizó para determinar los grupos carbonilos e hidroxilos fenólicos disociados, para lo cual se hizo una titulación potenciométrica con hidróxido de Sodio, previo intercambio con KCl. Así se determinó el grado de sustitución y en consecuencia la capacidad de intercambio de estas macromoléculas. En el

esquema 7 se muestra su procedimiento.

Esquema 7. Determinación de Acidez Total



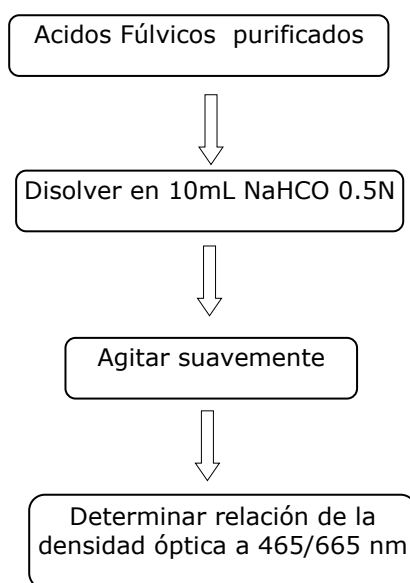
5.6.3. Espectroscopía Infrarroja.

Con el objeto de caracterizar bandas típicas de Ácidos Fúlvicos, se tomó el espectro IR, con un equipo Perkin-Elmer 1000. Este procedimiento se realizó preparando una pastilla de bromuro de potasio mezclada con la muestra de Ácido Fúlvico y registrando debidamente el espectro.

5.6.4. ***Espectroscopía Ultravioleta-Visible. Relación de densidades ópticas entre 465 y 665nm . (Relación E₄/E₆)***

Se realizó esta medición para conocer la densidad óptica de los Ácidos Fúlvicos, que depende la estructura química, el peso molecular, el contenido de dobles enlaces conjugados. Se determinó la relación entre el contenido de carbón aromático y el carbón de cadenas alifáticas. Esta medición se hizo sobre una dilución del ácido fúlvico en NaHCO₃. El esquema 8 muestra su procedimiento.

Esquema 8. Relación E₄/E₆

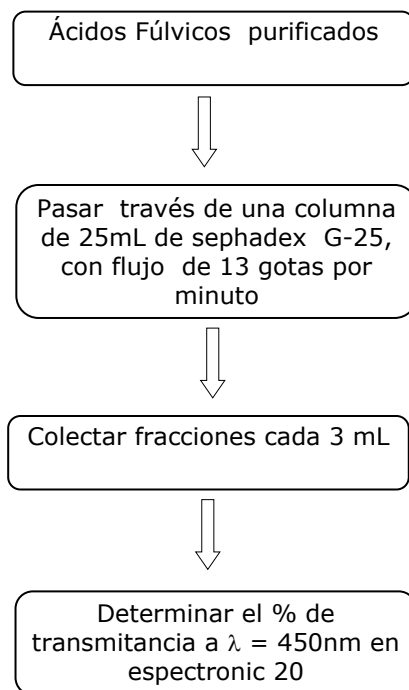


5.6.5. ***Filtración a través de sephadex G-25.***

En esta técnica se usó un gel de dextrano modificado obtenido por entrecruzamiento de una molécula lineal de polisacárido, conocido comercialmente como Sephadex, para formar una red tridimensional en la que el tamaño del poro está dado por el grado de entrecruzamiento del polímero. Así se realizó la separación de la macromolécula de carácter heterogénea, en fracciones homogéneas. El procedimiento, como muestra el esquema 9, se realiza en una columna cromatográfica con el objeto de separar las fracciones de acuerdo al tamaño molecular. Este gel G-25 tiene un rango de

fraccionamiento entre 100 y 5000 unidades de peso molecular.

Esquema 9. Filtración a través de sephadex G-25



5.6.6. *Análisis de Microscopía Retrográfica de los Ácidos Fúlvicos.*

Con el objeto de obtener una microfotografía de los Acidos Fúlvicos ya purificados se realizó este análisis, el cual consistió en tomar imágenes por nicoles paralelos de luz polarizante a los Acidos Fúlvicos, utilizando como medio dispersante Salicilato de Metilo con Índice de Refracción de 1.54. Esta fotografía se tomó con un aumento de 4 x 3.3.

6. RESULTADOS Y ANALISIS

6.1. ANÁLISIS FÍSICOS Y QUÍMICOS DE LOS DOS TIPOS DE SUELOS.

En la tabla 1 se presentan los resultados de la caracterización de dos horizontes de los suelos estudiados, la cual fue realizada en el Laboratorio de Suelos del Instituto Geográfico Agustín Codazzi.

Tabla 1. Análisis Físicos y Químicos de del Andisol y Oxisol HA y HB

MUESTRA	GRANULOMETRIA			CLASE TEXTURAL	pH	%C	%N	P	%MO
	%ARENA	%LIMO	%ARCILLA						
Andisol HA	48	34	18	Franco	5.17	8.71	1.08	2.5	15.8
Andisol HB	66	26	8	Franco-arenoso	5.47	4.52	0.53	1.2	8.3
Oxisol HA	62.8	10.3	26.9	Franco-arcillosa	3.5	1.68	0.14	4	2.89
Oxisol HB	44.8	19.3	35.9	Arcillosa	3.9	0.89	0.076	1	1.53
Complejo de Cambio									
MUESTRA	CIC	Ca	Mg	K	Na	BT	%SB	Ca/Mg	
Andisol HA	60.41	0.45	0.23	0.26	0.06	1.00	1.7	1.95	
Andisol HB	41.87	0.15	0.07	0.11	0.04	0.37	0.9	2.14	
Oxisol HA	8.5	0.03	0.10	0.04	0.04	0.21	2.5	0.3	
Oxisol HB	9.0	0.40	0.03	0.04	0.04	0.51	5.7	13.33	
Elementos Menores en ppm								Meq/100g	
MUESTRA	Mn	Fe	Zn	Cu	B	Al			
Andisol HA	0.08	10.48	0.12	0.02	0.17	0.90			
Andisol HB	0.06	5.52	0.06	0.02	0.19	0.13			
Oxisol HA	1.9	161.0	0.7	N.D	0.12	3.3			
Oxisol HB	0.4	63.8	0.5	N.D	0.04	2.2			

En los suelos estudiados se observa que el horizonte A (HA) del Andisol, donde el clima es templado, tiene una profundidad de 0-40 cm y el horizonte HB(HB)

de 40-60 cm, mientras en el Oxisol, donde el clima es cálido, el horizonte A se ubica entre una profundidad de 0-9cm y en el horizonte B entre 9-24 cm.

De los datos consignados en la tabla 1 se observa que ambos suelos el Andisol y el Oxisol presentan características diferentes.

De esta forma para el Andisol por su textura se clasifica como un suelo adecuado para cultivos debido a que es un suelo franco en su horizonte A, el cual presenta buenas características de aireación, permeabilidad y retención de nutrientes, lo que se atribuye al contenido de porcentaje de arcillas y de materia orgánica. En el Horizonte B de este suelo se presenta una textura franco-arenosa debido al menor porcentaje de materia orgánica y de arcillas, sin embargo aún puede considerarse como capa arable.

Este suelo presenta valores de pH alrededor de 5, lo que indica un suelo fuertemente ácido, esta acidez se debe al aluminio intercambiable, al Fe, pero en su gran mayoría se puede atribuir al alto contenido de Materia Orgánica que indica acumulación de capas sucesivas, sin que haya suficiente mineralización o transformación por parte de los microorganismos. También se puede observar una baja relación C/N en ambos horizontes, debido a los altos contenidos de N y a la baja tasa de mineralización. Los contenidos de Al debido a la acidez intercambiable, en el Andisol son bajos y clasifican dentro del rango de no tóxicos. Los contenidos de Fe disponible también se encuentran relativamente bajos.

Presenta altos valores de Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC), debido probablemente al alto contenido de materia orgánica, sin embargo presenta bajas cantidades de Ca, Mg, Na y K intercambiables y en general bajo porcentaje de Saturación de Bases, que significa probablemente bajo grado de humificación, sin embargo la relación Ca/Mg se encuentra dentro del límite óptimo. Los niveles de fósforo son también muy bajos en ambos horizontes

debido a la alta acidez. En general en este suelo se puede considerar que en el horizonte B hay menor proporción de todos los nutrientes.

Por otra parte el Oxisol en general presenta altos contenidos de arcilla, debido al alto grado de intemperización en estos suelos. El HA está dentro de los suelos francos, sin embargo los porcentajes de materia orgánica son bajos lo que implica un suelo pobre en nutrientes.

El Oxisol presenta pH extremadamente ácido debido a las altas cantidades de Fe y Al que inmovilizan el P, además presenta bajo contenido de materia orgánica, lo que indica una alta velocidad de meteorización con intenso lavado, que produce baja CIC, bajo porcentaje de Saturación de bases y bases totales y en general bajo contenido de todos los nutrientes. Se detecta un lavado o lixiviación de nutrientes hacia horizontes más profundos, atribuible a que son suelos bien drenados.

Los Oxisoles se caracterizan por presentar altas velocidades de meteorización, resultantes del clima: altas temperaturas, elevada precipitación e intenso lavado. Estos factores explican la acumulación de propiedades desfavorables de dichos suelos: baja reserva de bases, capacidades de cambio bajas, suelos muy ácidos, presencia de minerales arcillosos del tipo 1:1 y óxidos de Fe y Al. Bajo estas circunstancias el ciclo biogeoquímico y la materia orgánica adquieren una importancia considerable, ya que constituyen la única fuente de elementos asimilables: nitrógeno, fósforo, bases de cambio, oligoelementos, etc y por lo tanto representan el único soporte de fertilidad natural en estos suelos. Estos elementos permanecen en forma asimilable solo mientras están retenidos por los horizontes humíferos. En otras palabras la materia orgánica se constituye en un factor crítico en la determinación del potencial agrícola de los suelos tropicales.

6.2. SEPARACIÓN DE LA MATERIA ORGÁNICA HUMIFICADA (MOH) DE LA MATERIA ORGÁNICA LIBRE (MOL).

La etapa inicial para la caracterización de los ácidos fúlvicos es la separación de la materia orgánica fresca o libre de la fracción humificada. Aunque actualmente no existe un método preciso, mediante el cual se puedan separar los compuestos húmicos de la materia orgánica fresca; se tiene conocimiento de dos metodologías, una de tipo físico que se basa en las diferencias en densidad y el otro tiene como base las diferencias de tamaño entre los constituyentes de los complejos órgano-minerales y otras partículas del suelo (1). Después de analizar las dos metodologías se optó por una combinación de los métodos con el fin de obtener con mayor seguridad la materia humificada como tal, para así poder realizar la posterior caracterización de los ácidos fúlvicos.

6.2.1 Separación mediante el método granulométrico.

La primera separación se realizó por el método granulométrico partiendo de 35g de suelo seco en invernadero y tamizado en malla 2mm. Se trabajaron dos horizontes de cada muestra, realizando por triplicado cada muestra.

En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos en el proceso de separación granulométrica y la distribución de las fracciones de acuerdo a su tamaño y la cantidad de muestra obtenida.

Tabla 2. Distribución de fracciones de acuerdo con el método granulométrico.

MUESTRA	FRACCION <50 μ (MOH) (g)	%	FRACCION > 50 μ (MOL)(g)	%
Andisol HA	31.13	89	3.13	8.94
Andisol HB	5.3	15.1	29.03	82.94
Oxisol HA	14.35	41	20.62	58.91
Oxisol HB	12.25	35	22.4	64

En la tabla 2 se observa que en el horizonte HA del Andisol la mayor parte de la materia orgánica es menor de 50 micras lo que indica mayor cantidad de materia orgánica humificada unida a la fracción mineral. La fracción de materia orgánica libre es de solo un 8.94%, mientras que en el horizonte B sucede lo contrario. Esto hace suponer que la humificación en el suelo es un proceso bioquímico desarrollado en forma aerobia y que depende de las condiciones nutritivas del suelo, que en este caso son lógicamente mejores en el horizonte A.

En cambio en el Oxisol hay mayor cantidad de materia orgánica libre tanto en el horizonte A como en el B, por lo que se atribuye probablemente a la alta acidez del suelo y al bajo estado nutricional que impide un buen proceso de humificación.

6.2.2. Separación mediante el método densimétrico.

Para asegurar la separación de la Materia Orgánica Humificada (MOH) de la Materia Orgánica Libre (MOL), se aplicó el método densimétrico a la fracción < de 50 μ obtenida anteriormente.

Se partió de 10 g de materia orgánica humificada (MOH) y en la tabla 3 se muestran los pesos obtenidos.

Tabla 3. Fracciones obtenidas mediante el método densimétrico

MUESTRA	(MOH) (g)	%	(MOL) (g)	%
Andisol HA	9.08	90.8	0.92	9.2
Andisol HB	9.06	90.6	0.94	9.4
Oxisol HA	9.34	93.4	0.66	6.6
Oxisol HB	9.45	94.1	0.59	5.9

Al analizar la tabla 3 se deduce que al aplicar la separación densimétrica entre la MOH y la MOL se pudo recuperar un 9.2 y 9.4% de MOL, en los respectivos horizontes del Andisol que según el método granulométrico se consideraba como humificado. En el caso del Oxisol este porcentaje fue de 6.6 y 5.9%

para cada horizonte y aunque es menor, esto demuestra que la combinación de las dos metodologías es más eficiente. De los resultados se dedujo que existe una pequeña fracción de materia orgánica libre ligada a la fracción menor de 50 μ .

6.2.3. Contenido de Carbono de cada una de las fracciones.

Los porcentajes de Carbono de las fracciones obtenidas para el Andisol se presentan en la tabla 4 y figura 1.

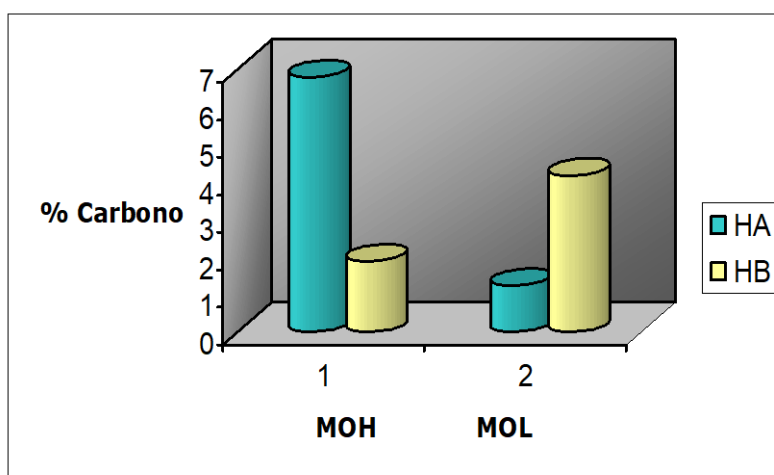


Figura 1. % Carbono de MOL y MOH para Andisol.

Tabla 4. % Carbono para Andisol.

SUELO	%C MOH<50	%C MOL
Andisol HA	6.8	1.24
Andisol HB	1.89	4.17

Al analizar la figura 1 y la tabla 4, se puede deducir que en el horizonte A (HA) hay mayor cantidad de carbono en la Materia Orgánica Humificada (MOH) que en Materia Orgánica Libre (MOL), mientras que para el horizonte B (HB) hay mayor cantidad de carbono en MOL que MOH. Esto se atribuye al mayor contenido de nutrientes y a la aireación del horizonte A en

este suelo que permite un adecuado proceso de oxidación y biotransformación de la Materia Orgánica por parte de los microorganismos.

Los porcentajes de carbono para el Oxisol se presentan en la tabla 5 y figura 2.

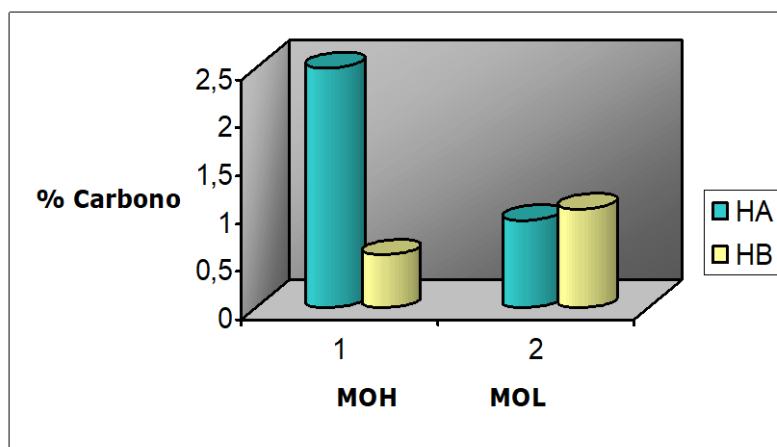


Figura 2. % Carbono de MOH y MOL para Oxisol.

Tabla 5. % Carbono para Oxisol.

SUELO	% C MOH < 50	%C MOL
Oxisol HA	2.5	0.91
Oxisol HB	0.55	1.03

En la tabla y figura 2 se observa que el oxisol tiene igual comportamiento que en el andisol, pero con menores contenidos de carbón de MOH y MOL, lo que se explica por las condiciones nutricionales de este suelo.

Además de los valores de porcentaje de Carbono realizado por el método de Walkey-Black, las fracciones se sometieron a un análisis elemental en el analizador Leco-1000. Los resultados se presentan en la siguiente tabla.

Tabla 6. Resultados de %CHN de Muestra Inicial (MI) y Materia Orgánica Humificada (MOH)

MUESTRA	% C	%H	%N	C/H
M.I. Andisol HA	14.53	3.06	0.75	4.8
M.I. Andisol HB	6.5	3.03	0.28	2.1
M.I. Oxisol HA	1.95	0.74	0.06	2.6
M.I. Oxisol HB	1.20	0.68	N.D	1.8
M.O.H.Andisol HA	12.41	2.68	N.D.	4.6
M.O.H.Andisol HB	6.5	2.55	0.34	2.6
M.O.H. Oxisol HA	3.48	1.59	0.29	2.2
M.O.H. Oxisol HB	2.40	1.54	0.08	1.6

Este análisis elemental de la tabla 6, revela que los contenidos de C, H y N de la Muestra Inicial (M.I) y de la Materia Orgánica Humificada (MOH) en los dos suelos, disminuyen con el incremento de la profundidad del suelo, esto se debe a que las pérdidas del material orgánico son mayores que las adiciones una vez estos horizontes sean sepultados por nuevas capas. Esta reducción ha sido reportada por Inohue y Higassi (1988) para Andisoles en Japón, Kenia e Indonesia. Resultados similares son reportados por Arango (43).

Se aprecia además que no hay gran diferencia entre los valores de C/H de M.I. y MOH comprobando que en la materia orgánica predomina la M.O.H.

6.3. EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN DE LAS SUSTANCIAS HÚMICAS.

Esta etapa se refiere al estudio del humus propiamente dicho, e incluyó una serie de fraccionamientos mediante la aplicación simultánea de ultrasonidos y líquidos densos, se separó una fracción denominada humina residual o heredada, de características muy semejantes a la materia orgánica fresca. Se considera formada por los constituyentes de las membranas parcialmente oxidadas y ligadas a las arcillas por enlaces de poca estabilidad (Duchafour, 1984) esta fracción se supone derivada directamente de la transformación directa e incompleta de la lignina, es decir sin pasar por una fase soluble. El

mecanismo de formación, considerado como una vía indirecta de la humificación, consistiría en pérdida de grupos metoxi de la lignina y adquisición de grupos carboxilo. Las uniones que se establecen en los agregados del suelo con las arcillas, son suficientemente lábiles como para desaparecer con la acción de ultrasonidos. Se partió de 5 gramos de materia orgánica humificada (MOH) y los resultados promedios de tres réplicas se muestran en la tabla 7.

6.3.1. Extracción de la Humina Heredada

Tabla 7. Resultado de Humina Heredada.

MUESTRA	HUMINA HEREDADA (g)	%
Andisol HA	0.2118	4.2
Andisol HB	0.1290	2.58
Oxisol HA	0.0454	0.91
Oxisol HB	0.0280	0.56

De la tabla 7 se puede observar que para los dos suelos Andisol y Oxisol, el porcentaje de humina heredada es mayor en el Horizonte A (HA) que en Horizonte B (HB). Esta fracción es muy importante ya que hace posible que los microorganismos continúen su desarrollo e interacción con el suelo.

Se observa que el porcentaje de humina heredada es mayor en el Andisol que en el Oxisol lo que se puede atribuir probablemente a que el grado de humificación en el Andisol sea menor que en el Oxisol.

6.3.2 Extracción de la Humina, Ácidos Húmicos y Ácidos Fúlvicos.

6.3.2.1. Extracción de la Humina. Los resultados de peso, porcentaje de Carbono y de distribución se presentan en la tabla 8.

Tabla 8. Peso final de la Humina (% C No extractable).

MUESTRA	w FRACCIÓN HUMINA	%	% C
Andisol HA	1.22	24.5	2.98
Andisol HB	1.59	31.8	1.48
Oxisol HA	2.75	55	1.73
Oxisol HB	2.96	59.2	0.92

En la tabla 8 se observa que hay mayor cantidad de humina en el HB que en HA, siendo mayor el contenido en el Oxisol, lo que indica que esta fracción de Carbono no extractable es alta, lo que incide probablemente en el grado de humificación.

Esto esta de acuerdo a lo reportado por Fox y Wada (36), quienes afirman que el porcentaje de extractabilidad de la materia orgánica en suelos tropicales, como Oxisoles y Andisoles, debe ser menor del 50%. Este bajo grado de extracción, afirman los investigadores, se debe probablemente a una fuerte unión con los óxidos de Fe y Al, lo que sin duda afecta la estabilidad de los agregados arcillo-húmicos.

Además según Oades, citado por Fox, en suelos de las regiones tropicales, comúnmente lixiviados, la máxima extratabilidad tiende a concentrarse en fracciones de tamaño entre 2 y 20 micras. Probablemente los tejidos de las plantas con tamaños dentro este rango se descomponen fácilmente, mientras la materia orgánica de tamaño menor de 2 micras se ligaría fuertemente a las arcillas, por intermedio del hierro y el aluminio, limitando su extracción.

6.3.2.2. Separación de Ácidos Fúlvicos y Ácidos Húmicos.

Con el objeto de evaluar el contenido de las sustancias húmicas extractables de acuerdo con su unión organo-mineral, se realizó una extracción sucesiva con Tetraborato de Sodio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) 0.1N pH 9.7, Pirofosfato de Sodio ($\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$) 0.1 N pH 9.8 e Hidróxido de Sodio $\text{Na}(\text{OH})$ 0.1 N pH 12. Los resultados de estas extracciones se muestran en las siguientes tablas y gráficas, con parámetros como porcentaje de Carbono de Ácidos Fúlvicos

(%CAF), porcentaje de Carbono de Ácidos Húmicos (%CAH) y porcentaje de Carbono Extractable (%CE)

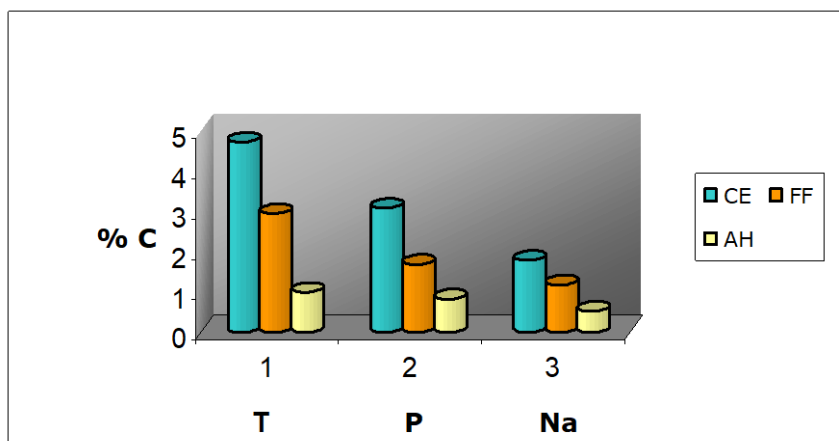


Figura 3. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Andisol

Tabla 9. Efecto del extractante sobre el %C de AH y % CAF del Horizonte A del Andisol

Sin EXTRACTANTE	% CE	%FF	% AH	CAH/FF
Tetraborato de Sodio	4.72	2.95	1.0	0.34
Pirofosfato de Sodio	3.08	1.69	0.83	0.49
Hidróxido de Sodio	1.79	1.18	0.53	0.45

En la figura 3 y la tabla 9 se puede observar que la mayor extracción se realizó con Tetraborato de sodio, indicando que en la Materia Orgánica de este horizonte predominan los enlaces electroestático sobre los de coordinación y de resto de enlaces con la materia orgánica. El orden de extracción para este horizonte sería T>P>Na. Contrario a lo reportado por Almendros (55) que dice que las sustancias húmicas obtenidas por distintos extractantes disminuye en sentido piro, mayor que soda, mayor que tetraborato, resultando concordante con la acción fuertemente complejante del piro y el efecto complementario de la soda, al actuar sobre el material ya descomplejado por el extractante anterior.

En cuanto a cantidad de Acidos Fúlvicos (AF) en la Fracción Fúlvica (FF) y Acidos Húmicos (AH), se puede observar que es mayor el porcentaje de carbono de los AF que de los AH, lo cual generalmente se presenta en Andisoles, indicando que aún es incompleto el proceso de humificación, debido a su afinidad de formar complejos con el Fe y el Al

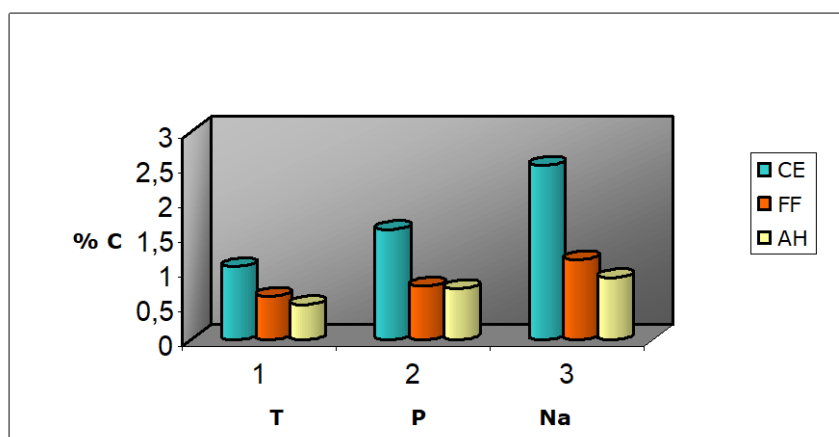


Figura4. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte B del Andisol

Tabla 10. Efecto del extractante sobre el %C de AH y AF del Horizonte B de Andisol

Sin EXTRACTANTE	% CE	%AF	% AH	CAH/CAF
Tetraborato de Sodio	1.06	0.63	0.51	0.81
Pirofosfato de Sodio	1.59	0.78	0.74	0.95
Hidróxido de Sodio	2.52	1.16	0.9	0.77

De la figura 4 y la tabla 10 para el horizonte B (HB) del Andisol, se observa que es mayor el porcentaje de carbono extractable (%CE) con Hidróxido de Sodio, lo cual indica que la materia orgánica de este horizonte está más ligada a la fracción mineral, y esto significa un proceso de humificación mas consistente, ya que los microorganismos del suelo han efectuado un proceso bioquímico a través de exoenzimas para lograr la unión entre la materia orgánica y la fracción mineral. En este caso la fracción humificada es menor

pero con un mayor grado de humificación lo cual se comprueba con la relación CAH/CAF, la cual es mayor con todos los extractantes con respecto a la de los del horizonte A, por lo que un extractante fuerte como la solución de Hidróxido de Sodio es capaz de extraerla. El orden de extracción para este horizonte es Na > P > T., contrario al HA.

El hecho de obtener menor extracción con Tetraborato, revela que en este horizonte se encuentran menos sustancias con enlaces electroestáticos que en HA, indicando nuevamente que la materia orgánica ya ha sido bien transformada y que por lo tanto las uniones entre la materia orgánica y la fracción mineral son más fuertes. A medida que los microorganismos van descomponiendo las capas de materia orgánica, sucesivamente se va depositando en el fondo la materia orgánica ya humificada y la transformación sigue hacia la materia orgánica menos descompuesta

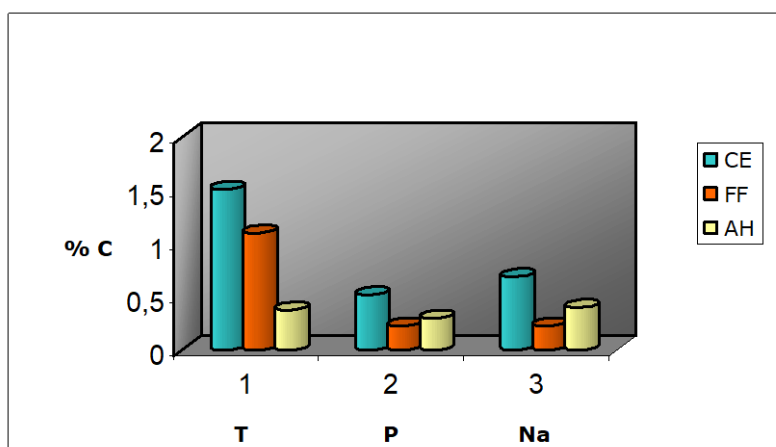


Figura 5. Efecto del extractante sobre el %C de AH y FF del Horizonte A del Oxisol

Tabla 11. Efecto del extractante sobre el %C de AH y AF del Horizonte A del Oxisol

Sin EXTRACTANTE	% CE	%AF	% AH	CAH/CAF
Tetraborato de Sodio	1.51	1.10	0.38	0.35
Pirofosfato de Sodio	0.52	0.23	0.30	1.30
Hidróxido de Sodio	0.69	0.23	0.40	1.74

En la figura 5 y tabla 11 para el Oxisol horizonte HA se aprecia que el mayor porcentaje de Carbono Extractable se obtiene con Tetraborato de Sodio, seguido del Hidróxido y por último el pirofosfato, por lo que la materia orgánica de este horizonte se encuentra unida a la fracción mineral mediante enlaces covalentes, especialmente entre la M.O y las arcillas por óxidos e hidróxidos metálicos, los cuales son mas fáciles de romper. El orden de extracción en este horizonte sería T>P>Na.

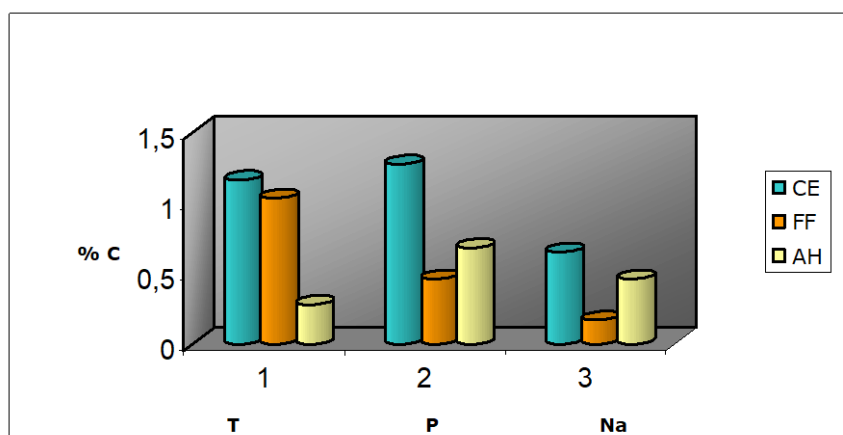


Figura 6. Efecto del extractante sobre el %C de AH y AF del Horizonte B del Oxisol

Tabla 12 Efecto del extractante sobre el %C de AH y AF del Horizonte B del Oxisol

Sin EXTRACTANTE	% CE	%AF	% AH	CAH/CAF
Tetraborato de Sodio	1.16	1.03	0.28	0.27
Pirofosfato de Sodio	1.27	0.46	0.68	1.48
Hidróxido de Sodio	0.65	0.17	0.46	2.70

En este horizonte hay mayor extracción de sustancia húmicas con Pirofosfato de sodio, es ligeramente superior a la que se obtiene con Tetraborato de sodio, como lo muestra la figura 6 y la tabla 12, deduciéndose un predominio de Materia Orgánica unida a la fracción mineral mediante enlaces de coordinación que no son tan fáciles de romper y por esto se presenta un mayor grado de humificación (1.48) que el obtenido con el Tetraborato (0.27)

La extracción con solución de Hidróxido de Sodio mucho menor, pero esta fracción presenta también un alto índice de humificación, por tener uniones fuertes entre la Materia Orgánica y la fracción mineral, difíciles de romper y por lo tanto más estables.

Resumen de las tablas anteriores

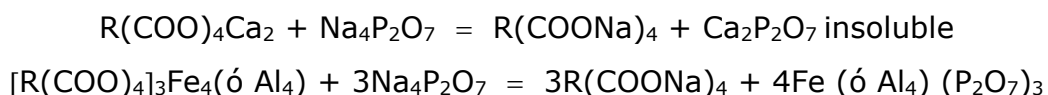
Tabla N 13. % C de AH y AF con diversos extractantes

MUESTRA	TETRABORATO		PIROFOSFATO		HIDROXDO	
	%CAH	%CFF	%CAH	%CFF	%CAH	%CFF
Andisol HA	1.0	2.95	0.83	1.69	0.53	1.18
Andisol HB	0.51	0.63	0.74	0.78	0.9	1.6
Oxisol HA	0.38	1.10	0.30	0.23	0.40	0.23
Oxisol HB	0.28	1.035	0.68	0.46	0.46	0.17

De acuerdo a los resultados obtenidos y resumidos en la tabla 13, la mayor extracción se realizó con Tetraborato de Sodio, la posible reacción que se presenta es la siguiente:



Las reacciones químicas que tendrían lugar en el proceso de extracción con Pirofosfato de Sodio serían:



Por lo tanto el $Na_4P_2O_7$ muestra buena efectividad en los suelos donde las sustancias húmicas se encuentran libre, o en forma de humatos (de calcio, hierro y aluminio) como en los suelos turbosos.

Los extractos de $Na_4P_2O_7$ se oxidan más y tienen menos similitud con la lignina y menor peso molecular que los extractos con Hidróxido de Sodio.

De acuerdo con Cegarra, se deduce que si bien el Pirofosfato sódico no es el extractante ideal, pues entre otras deficiencias tiene la de su relativamente bajo poder extractante, pero en cambio se puede afirmar que reúne condiciones inmejorables para nuestros materiales orgánicos, en los que se producirían intensamente reacciones de neoformación en caso de usarse extractantes muy alcalinos.

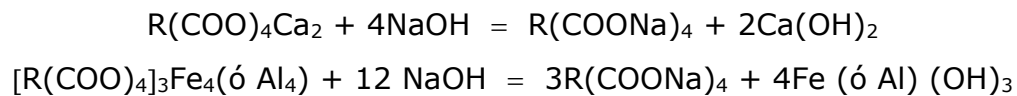
Ya se ha comprobado que la extracción con Pirofosfato de Sodio es menor que con Soda, lo cual se debe a la diferente fuerza iónica de esta solución. El Pirofosfato de Sodio 0.1M en 0.1 N de NaOH tiene una fuerza iónica de 1.1, mas de diez veces la del Hidróxido de Sodio 0.1N. Esta gran diferencia pudiera provocar que una parte de los AH grises coagularan, no pudiendo por tanto extraerse en este primer tratamiento. (Kononova 1961)

Duchafour utiliza también el Pirofosfato de Sodio como extractante al igual que Kononova, pero le añaden sulfato de Sodio para elevar mas la fuerza iónica de la solución extractante, el pH de esta solución es de 7.5.

El Pirofosfato de Sodio, dispersa perfectamente el complejo húmico arcilloso y libera los compuestos húmicos de los compuestos insolubles saturados de calcio, hierro o aluminio, sin embargo todavía es fuertemente alcalino y aunque en un grado menor , puede ofrecer el mismo inconveniente que la Soda, es decir alterar la materia fresca y dar lugar a compuestos húmicos nuevos, lo cual se evita empleándolo a concentraciones poco elevadas y limitando el numero de extracciones sucesivas.

Es conocida la actividad del Hidróxido de Sodio como extractante, esta eficiencia se debe a su habilidad para degradar la materia orgánica del suelo y para disolver el Calcio, hierro y aluminio asociados a ella.

Las reacciones químicas que suceden en la extracción pueden representarse así:



El Hidróxido de Sodio tiene una doble acción, por una parte hace que se precipiten los hidróxidos de hierro y aluminio, liberando así los ácidos humosos unidos a estos cationes, por otra parte saponifica los enlaces entre los ácidos húmicos y fúlvicos. Los fulvatos y humatos sodicos son solubles en el pH de la solución empleada (pH 13), por lo que se pueden extraer fácilmente, ambas sales humosas pueden separarse fácilmente después acidificando la solución hasta pH 1-2.

Entre los inconvenientes de trabajar con Soda como único extractante se tiene que su solución alcali disuelve silicatos de la materia mineral y esta silica contamina las fracciones orgánicas separadas del extracto.

Las soluciones alcali disuelven componentes protoplásmicos y estructurales de los tejidos orgánicos fuertes y estos se llegan a mezclar con la M O Humificada.

Bajo condiciones alcalinas la auto oxidación de algunos constituyentes orgánicos ocurre en contacto con aire tanto durante la extracción como cuando los extractos se dejan en reposo.

Otros cambios químicos como la condensación entre aminoácidos y aldehídos o Quinonas pueden ocurrir en la solución alcalina.

Como el interés del trabajo es realizar una extracción en la que no se presenten alteraciones químicas se decidió realizar la extracción sucesiva incluyendo el Tetraborato de Sodio como primer extractante, seguido por Pirofosfato de Sodio y por último con Hidróxido de Sodio.

6.4. PURIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS FÚLVICOS.

6.4.1. Purificación de la Fracción Fúlvica.

Se trabajó con los sobrenadantes extraídos con tetraborato, pirofosfato e hidróxido de Sodio, los cuales se denominan Fracción Fúlvica que contiene los Ácidos Fúlvicos y sales minerales. Para esto se utilizaron en forma sucesiva resinas de adsorción, de intercambio catiónico y membranas de diálisis.

Como uno de los objetivos es comprobar la eficiencia de la metodología de resina y/o membrana de diálisis, se realizaron pruebas con los primeros extractos de FF sometidos a diálisis solamente. Es importante tener en cuenta que el tamaño de poro de la membrana es de 3500 daltons. Se comprobó por los resultados obtenidos, que esta metodología no es descartable, puesto que los dializados se obtienen con un valor de pH alrededor de 4 y conductividad menor de 200 μs apropiada para la liofilización. Sin embargo para este caso hay algunos inconvenientes como; la gran cantidad de membrana que debe usarse, ya que aquí todo el extracto se sometería a diálisis, por lo tanto, el proceso tomaría un largo.

Además el tiempo de permanencia de la solución en la membrana tardaba de 8 a 10 días en diálisis para tener valores óptimos para la liofilización lo cual alargaba aún más el proceso.

Se procedió por lo tanto a utilizar la resina de adsorción, Amberlita XAD-16, seguida de la resina de intercambio, Rexyn 101 H⁺ Con ambas resinas se realizaron pruebas para ensayar su capacidad y la forma como se comportaban con sustancias húmicas.

Las resinas de adsorción XAD-16 tienen como base copolímeros de estireno-divinilbenceno, son aromáticas, de carácter hidrofóbico y no tienen capacidad de intercambio catiónico. (Lepane, 1999). De otro lado, se sabe que los ácidos fúlvicos en estado iónico interactúan con las resinas de estireno-divinilbenceno

por formación de enlaces π - π entre las estructuras aromáticas de las resinas y la sustancia húmica.

Se trabajó con una columna de 10mL con la resina de adsorción, sobre la cual se pasaron en promedio por cada 10mL de resina 1L de extracto.

Una vez retenidas las sustancias húmicas, se procedió a eluir las de la resina, con 120-160 mL de NaOH 0.7N. La fracción fúlvica eluída queda en forma de fulvatos de Sodio solamente, pues a través de la resina de adsorción se habían eliminado el tetraborato y el Pirofosfato de Sodio.

La elusión se hizo con NaOH 0.7N para poder eluir la mayor cantidad de Sustancias Húmicas de la resina, pues ésta debido a sus propiedades, retiene fuertemente este tipo de sustancias, y con concentraciones más bajas la elusión no era muy satisfactoria. Inclusive a esta concentración es apreciable que la resina que inicialmente es blanca al final de la elusión queda con un tono amarillento, mostrando un poco de sustancia retenida debido a su superficie de área alta. A este respecto, Lepane, 1999, explica que los AF tienen un gran impedimento estérico como consecuencia del grado de ramificación de su estructura, lo que dificulta la penetración en resinas de tamaño de poro menor de 100 Å; sin embargo, la resina de adsorción XAD-16 presenta un tamaño de poro de 90 a 100 Å lo que la hace adecuada para retención y posterior elusión de estas sustancias.

Como la concentración del Hidróxido de Sodio es alta, los valores de pH y de conductividad del extracto pasado a través de Amberlita XAD-16 son altos como se aprecia en la columna I de la tabla 14.

Los extractos eluidos a través de la resina de adsorción están en forma de fulvatos de Sodio y se pasaron luego a través de una resina de intercambio catiónico (Rexyn 101 H), la cual fue activada previamente con HCl 1N. Aquí se trabajó una columna de 50mL de resina, donde se pasaron los fulvatos de Sodio obtenidos anteriormente.

En la misma tabla 14, columna II se presentan los valores de pH y conductividad de los fulvatos, ya eliminado el Sodio y se pueden apreciar los valores de pH y conductividad presentan una fuerte disminución, por ejemplo de 90 a 6 ms de conductividad y pH de 13,4 a 2.2 indicándome la eliminación del NaOH presente en cada extracto.

Sin embargo la conductividad es aún muy alta por eso se pasa el extracto a través de una membrana de diálisis de tamaño de poro 3500 daltons, y se controló constantemente los valores de pH y conductividad. Se determinó que el tiempo promedio de diálisis fue de 24 a 48 horas, la cual se dedujo por los valores de pH alrededor de 4, los cuales concuerdan con los reportados por Barragán (55); la conductividad en promedio fue de 142-182 μS , por lo que es posible liofilizar satisfactoriamente, y de esta manera ser adecuadamente caracterizados. Estos valores se presentan en la misma tabla 14, columna III.

Tabla 14. Resultados de purificación secuencial de Fracción Fúlvica

MUESTRA	Eluído a través de Amberlita XAD16		Eluído a través de Rexyn 101 H		Eluído a través de Membrana de diálisis	
	I		II		III	
	CONDUCTIVIDAD (MS)	PH	CONDUCTIVIDAD (MS)	PH	CONDUCTIVIDAD (μS)	PH
Andisol HA (T)	90.4	13.48	6.75	2.27	142.13	4.04
Andisol HA (P)	91.7	13.69	6.17	2.19	158.6	3.73
Andisol HA (Na)	80.5	13.66	5.48	2.58	175.68	4.24
Andisol HB (T)	90.06	13.61	6.10	2.28	182.2	3.78
Andisol HB (P)	91.3	13.68	7.79	2.22	181.95	3.71
Andisol HB (Na)	93.4	13.65	6.77	2.15	163.1	3.5
Oxisol HA (T)	88.9	13.60	8.15	2.13	165.66	3.84
Oxisol HA (P)	78.6	13.20	6.50	2.21	161.42	3.80
Oxisol HA (Na)	84.0	13.33	6.86	2.44	127	4.02
Oxisol HB(T)	86.95	13.57	7.87	2.12	147.3	3.74
Oxisol HB (P)	93.1	13.60	8.21	2.11	145.72	3.93
Oxisol HB(Na)	92.5	13.66	7.34	2.03	164.2	3.78

6.4.2 Determinación de la efectividad de la purificación de los Ácidos Fúlvicos.

6.4.2.1. Análisis de Microscopía Pretrógráfica.

Se comprobó la eficiencia de la metodología de purificación tomando fotografías en un analizador Olympus x 60, el cual revela si las muestras presentan o no cristales de sales, en este caso sales de sodio. La Figura 7 muestra la fotografía tomada a la muestra dializada solamente, aquí se observa claramente la presencia aún de sales, mientras las muestras que fueron sometidas al proceso de purificación con resinas de adsorción, resina de intercambio y membrana de diálisis no los presentan (Figura 8).

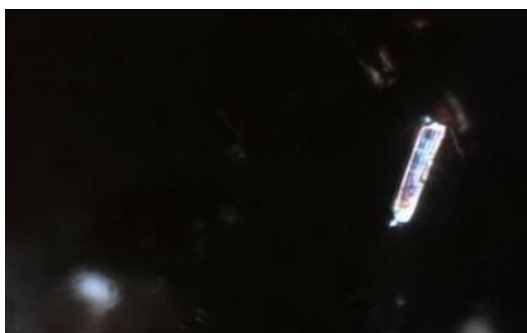


Figura 7. Muestra sometida a purificación con Membrana de diálisis



Figura 8. Muestra sometida a purificación con resina de adsorción Amberlita XAD-16, resina de intercambio (Dowex H) y membrana de diálisis.

Lo anterior indica que se deben utilizar en la purificación de Ácidos Fúlvicos las resinas de adsorción y de intercambio antes de la diálisis.

6.4.2.2. Análisis Infrarrojo.

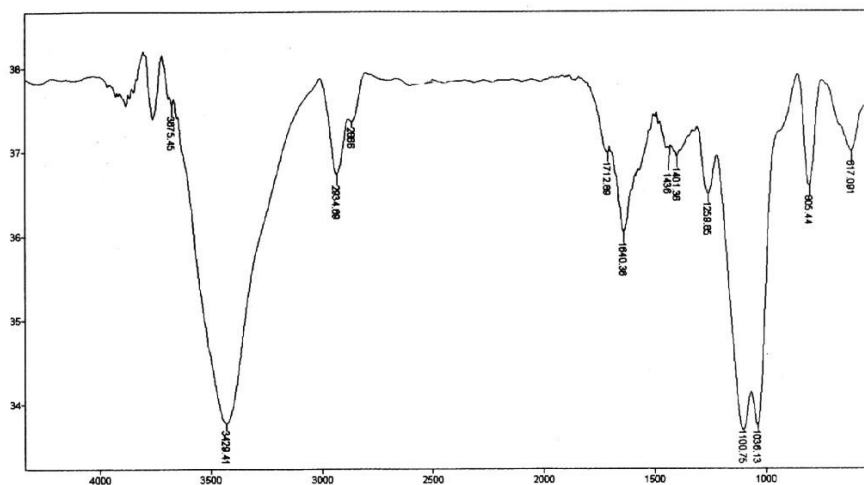


Figura 9. IR de AF purificados por membrana de diálisis.

En el IR de la figura 9 que corresponde a la muestra Andisol HA extraída con Tetraborato de Sodio y purificada solo con membranas de diálisis, se puede apreciar una banda alrededor de 1050 cm^{-1} que corresponde posiblemente a silicatos presentes a la muestra, demostrando que la purificación presenta deficiencias. El análisis de las demás bandas se presenta en la caracterización posterior.

6.5. CARACTERIZACIÓN DE LOS ÁCIDOS FÚLVICOS.

La muestra del Oxisol Horizonte B no fue posible Liofilizarla debido a que su cantidad era mínima, por lo tanto no aparecerán resultados de ella. . Las restantes muestras de Ácidos Fúlvicos fueron parcialmente caracterizados así;

6.5.1. Análisis elemental de los AF.

Este análisis se realizó en un equipo Leco-600 de Ingeominas, el cual arrojó los resultados de la tabla 15.

Tabla 15. Resultados CHN Leco-600

MUESTRA	%C	%H	%N	C/H	C/N
Andisol HA T	30.92	4.12	0.14	7.50	220.08
Andisol HA P	19.82	2.93	0.37	6.76	53.57
Andisol HA Na	25.70	4.00	0.21	6.42	122.38
Andisol HB T	16.25	3.06	0.44	5.31	36.93
Andisol HB P	25.97	3.41	0.16	7.61	56.46
Andisol HB Na	29.79	4.35	0.16	6.85	186.19
Oxisol HA T	36.10	5.05	0.15	7.14	240.67
Oxisol HA P	21.59	4.00	0.10	5.4	215.9
Oxisol HA Na	18.06	2.44	0.23	7.40	78.52
Oxisol HB T	28.35	3.94	0.21	7.19	135
Oxisol HB P	19.21	3.87	0.28	4.96	68.60

Al analizar los resultados de la tabla 15 y comparándolo con el análisis elemental de la fracción total del suelo o sea la Muestra Inicial y la Materia Orgánica Humificada (Tabla 6), se puede deducir que en los Ácidos Fúlvicos purificados de todas las fracciones y con todos los extractantes, se concentran los valores de Carbono y el Hidrógeno siguiendo la misma tendencia que la Materia Inicial, es decir son mayores los valores en el horizonte A que en el HB en los dos tipos de suelos.

Con el Nitrógeno (N) sucede lo contrario, es decir en general disminuye el Nitrógeno de los Ácidos Fúlvicos (AF) con respecto a la Muestra Inicial y a la M.O.H.. Esto indica probablemente que la mayoría del N del material inicial y de la M.O.H. pertenece a otra fracción diferente a la de los AF. Esto se comprueba en el espectro IR ya que la presencia de N es mínima y sus bandas características e intensas a 3500 no son detectables, solo a 1639 cm^{-1} se presenta solapada con la de tensión C=C de sistema conjugado.

Esto también se refleja en la alta relación C/N de todos los AF.

6.5.2. Acidez total y Relación E₄/E₆

La siguiente tabla resume los resultados obtenidos de Acidez total, grupos carboxílicos, grupos hidroxifenólicos y la relación E₄/E₆

Tabla 16. Resultados de Acidez total y relación E₄/E₆

MUESTRA	ACIDEZ TOTAL	GRUPO COOH	GRUPO OH	E ₄ /E ₆
Andisol HA T	3.43	1.37	2.06	7.1
Andisol HA P	3.8	0.6	3.2	7.5
Andisol HA Na	2.30	0.74	1.56	5.7
Andisol HB T	5.41	1.04	3.48	7.0
Andisol HB P	4	1.78	2.22	7.0
Andisol HB Na	0.98	0.30	0.68	3.9
Oxisol HA T	3.87	N.D	N.D	8.1
Oxisol HA P	2.53	N.D.	N.D.	4.0
Oxisol HA Na	3.03	N.D.	N.D.	3.8
Oxisol HB T	2.29	N.D	N.D	3.9
Oxisol HB P	4.19	1.58	2.61	4.0

En la tabla 16 se observa que la relación E₄/E₆ en el Andisol HA para todos los extractantes concuerda con lo reportado en la literatura (Arango) para Ácidos Fúlvicos (AF) de otros Andisoles, los cuales son altos, indicando poco grado de polimerización y de condensación o sea menor complejidad de las moléculas y por tanto menor peso molecular.

La relación E₄/E₆ para AF extraídos con Hidróxido de Sodio en el andisol HA es más baja que para AF extraídos con tetraborato de Sodio y pirofosfato de Sodio. De igual manera la acidez total es menor en los AF extraídos con Hidróxido de Sodio que con los otros extractantes y en este caso la acidez de grupos OH es mayor que la acidez de grupos COOH, por lo que las moléculas de Ácidos Fúlvicos extraídos con Hidróxido de Sodio tiene mayor peso molecular, mayor grado de polimerización y de condensación y por tanto mayor complejidad en sus moléculas. Esto se atribuye probablemente a que el poder extractante del Hidróxido de Sodio es más fuerte que el de los otros dos

extractantes, debido a su habilidad para disolver Ca, Fe y Al asociados los AF, con una doble acción, haciendo precipitar los hidróxidos de Fe y Al y saponificando los enlaces entre los AF.

En general se observa que los Ácidos Fúlvicos (AF) extraídos con los 3 extractantes hay predominio de la acidez debida a grupos OH de fenoles indicando que las moléculas de AF presentan estructuras con predominio de grupos fenoles, esto se confirma en los espectros IR, donde las bandas OH alrededor de 3430 y a 1150cm⁻¹ son bastante definidas e intensas comparadas con las bandas características de grupos COOH a 1730 cm⁻¹ que son menos intensas.

Estos datos obtenidos coinciden con los reportados por Barragán et al.

En el Horizonte B (HB) del Andisol se aprecia el mismo comportamiento, sin embargo los AF extraídos con tetraborato presentan mayor acidez de grupos OH fenólicos que los del HA, pero la relación E₄/E₆ es la misma, indicando moléculas del mismo grado de condensación y polimerización pero probablemente con mayor grado de humificación, lo que se puede comprobar con el índice de humificación de las tablas N 8 y 9, (0.81 para HB y 0.34 para HA). Esto se deba a que las pérdidas de M.O (oxidación, mineralización, lavado) son mayores que las adiciones, una vez estos horizontes sean sepultados por nuevas capas de M.O. en este horizonte ya no hay mas transformación, porque ya ha terminado y el humus es más maduro.

En el oxisol Horizonte A (HA) se aprecia el mismo comportamiento, es decir que las moléculas de AF extraídos con NaOH presentan una relación E₄/E₆ mucho menor indicando mayor grado de condensación y polimerización y mayor complejidad en sus estructuras, por lo tanto mayor peso molecular. Las moléculas de AF extraídas con tetraborato presentan mucho menos complejidad estructural. Esto correlaciona con los índices de humificación que son mayores para los AF extraídos con NaOH que con pirofosfato y tetraborato de Sodio como lo indican las tablas 10 y 11, donde es mucho mayor los de HB.

Al comparar los dos tipos de suelos se puede deducir que sí hay diferencias entre el comportamiento estructural de los AF, de tal manera que los AF del Oxisol presentan mayor grado de condensación y polimerización y por tanto mayor complejidad de sus moléculas, esto indica la influencia de las condiciones ambientales, de la formación de los suelos y el tipo de vegetación, ya que los oxisoles son suelos muy bien aireados, altamente drenados y con un alto grado de meteorización, mientras que el andisol es un suelo donde se acumulan capas sucesivas de M.O. donde hay menos aireación y menos meteorización.

6.5.3. Análisis IR

Las sustancias húmicas extraídas del suelo no son un único compuesto químicamente puro, por lo tanto las bandas de absorción no son tan características de una sola sustancia sino de un conglomerado de moléculas.

Las figuras 10, .11, 12 y 13 Muestran los espectros de cada horizonte y con cada extractante, se puede apreciar que son bastante similares, varían un poco la intensidad de algunas bandas pero se observa que las presentes a 3400 y 1140 cm^{-1} son las más características de todos los espectros.

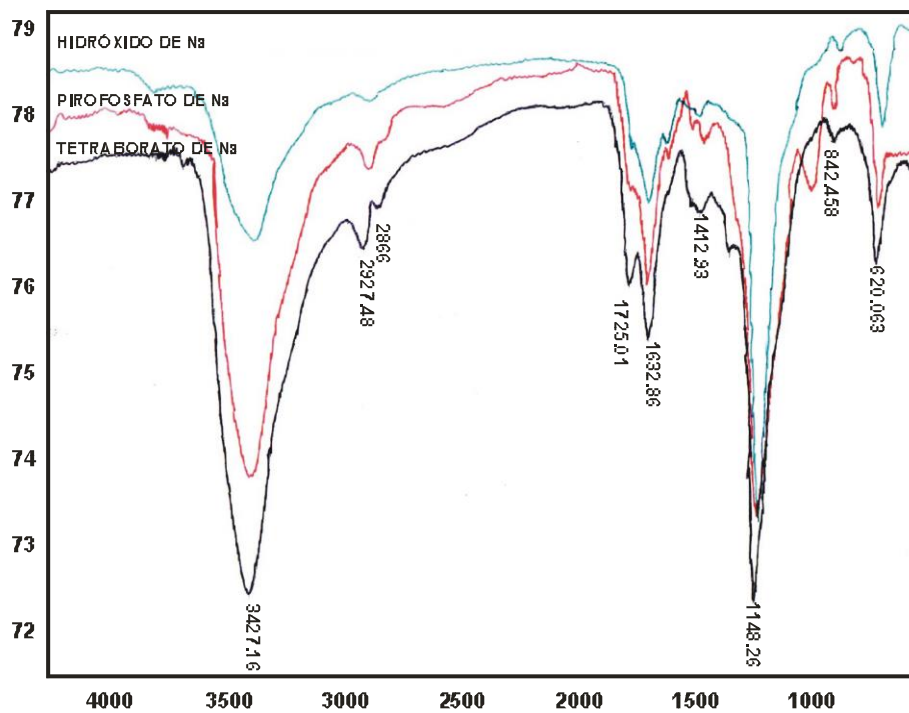


Fig. 10. Espectros IR Andisol HA con los 3 extractantes

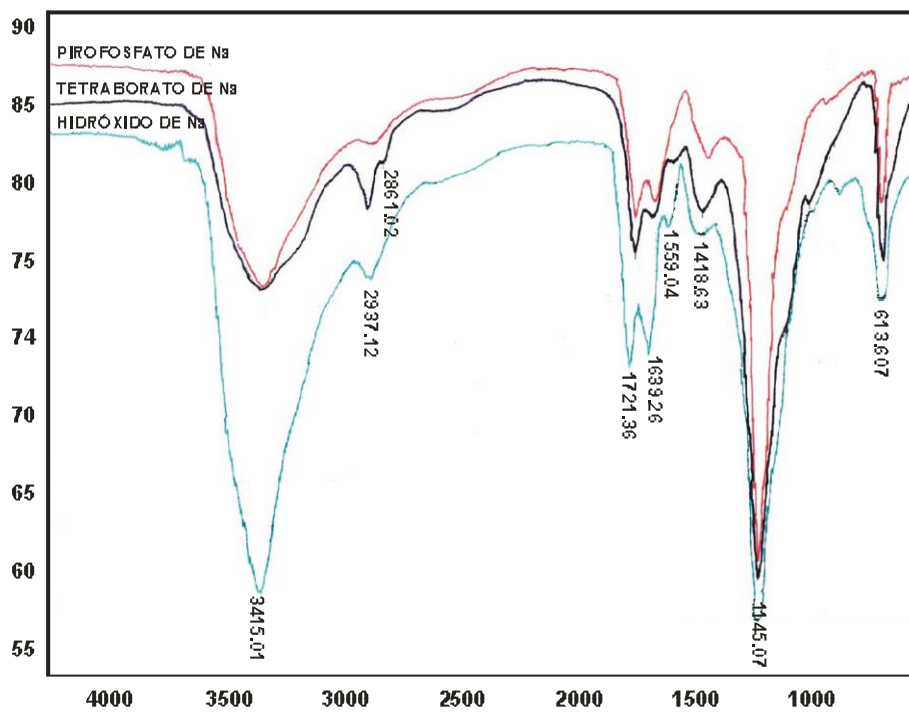


Fig. 11. Espectros IR Andisol HB con los 3 extractantes

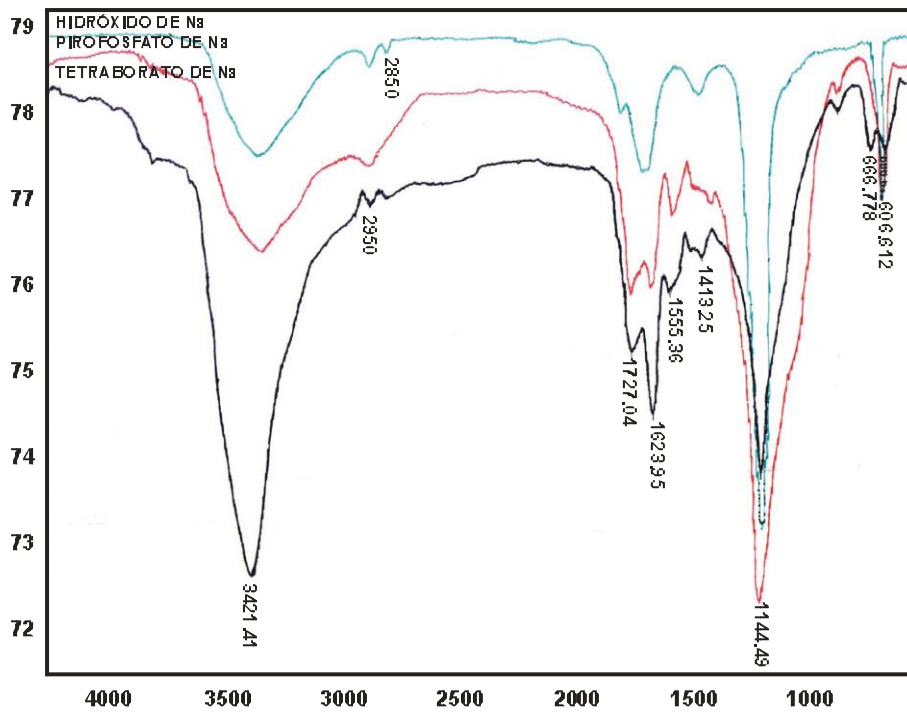


Fig. 12. Espectros IR Oxisol HA con los 3 extractantes

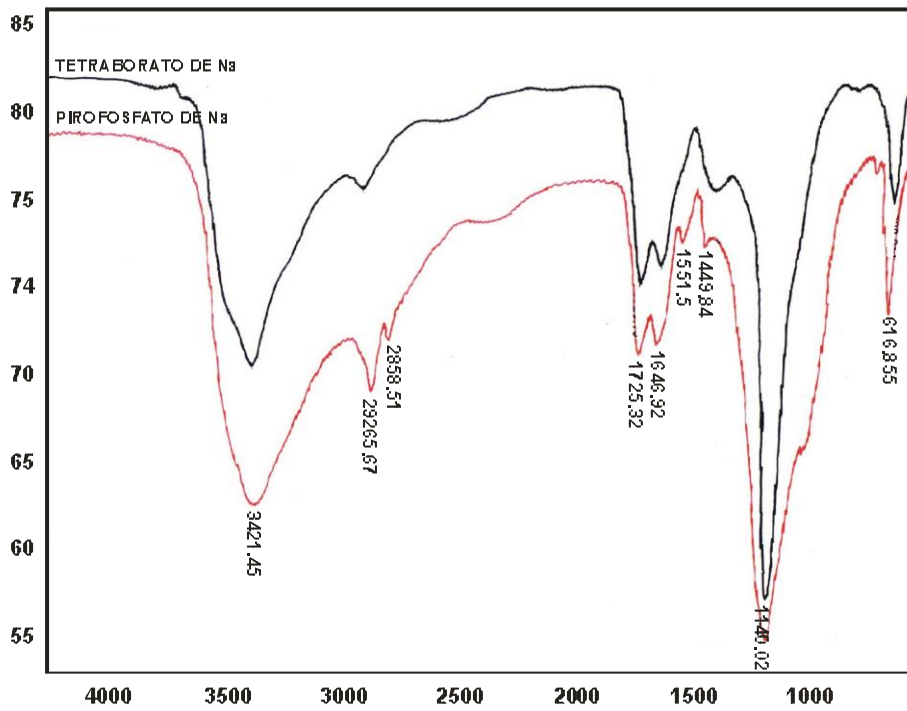


Fig. 13. Espectros IR Oxisol HB con los 3 extractantes

Las principales bandas de absorción de los espectros IR de los AF con todos los extractantes y en todos los horizontes se presentan a continuación.

3307-3430 cm^{-1} Se presenta una tensión de Grupos OH alcohólico con enlace probablemente de hidrógeno intermolecular que corresponde a sistema polimérico; banda de absorción ancha y fuerte; también puede aparecer en esta región el N-H libre asociado por enlaces de hidrógeno, la cual puede estar solapada.

2924-2950 cm^{-1} Estiramiento asimétrico de C-H saturado, mostrando clara evidencia de estructuras alifáticas como CH_2 y CH_3 , lo que se confirma a 1380-1480 donde hay flexión de CH de cadenas cortas.

2850-2866 cm^{-1} Tensión C-H, estiramiento simétrico de C-H saturado de estructuras alifáticas CH_2 .

1718-1734 cm^{-1} Tensión C=O en bandas de 1730-1710 cm^{-1} para sistema monomérico y 1700-1680 cm^{-1} para sistema dímero; 1725-1715 cm^{-1} tensión C=O de COO^- (desplazado por conjugación)

1623-1651 cm^{-1} Tensión C=C de sistema conjugado (aromático), en diversas intensidades y/o estiramiento asimétrico de COO^-

1545-1559 cm^{-1} Estiramiento aromático C=C, sales de aminas o amidas II

1383-1458 cm^{-1} Deformación asimétrica de enlaces CH_2 y CH_3

1140-1164 cm^{-1} Estiramiento C-OH alifáticos, en 1160 estiramiento de esteres y fenoles

784-842 cm^{-1} Vibraciones de C-H aromático fuera del plano.

612-674 cm^{-1} Tensión de alquenos conjugados

6.5.4 Filtración a través de sephadex G-25.

El anexo B muestra las gráficas de elusión con sephadex G-25 para todas las muestras y la tabla 17 el resumen de las fracciones obtenidas, en estas se observa que en los dos horizontes de ambos tipos de suelo con tetraborato y pirofosfato de Sodio como extractante, presentan un comportamiento similar, en donde se obtienen tres fracciones, predominando la primera fracción correspondiente a pesos moleculares mayores de 5000. Las otras dos fracciones tienen un porcentaje mas bajo y corresponde a las fracciones retenidas es decir a pesos moleculares entre 100 y 5000. Sin embargo en el horizonte B la fracción correspondiente a mayores de 5000 es superior que en el horizonte A. Esto indicaría que en el horizonte B el humus presenta un mayor grado de humificación debido a la mayor complejidad de sus moléculas, a la mayor condensación y polimerización.

Esto correlaciona con los valores de la relación E_4/E_6 y con menor el grado de acidez debido a grupos COOH y al mayor grado de acidez debido a grupos OH fenólicos , como se explicó anteriormente en la tabla 16.

Para la extracción con Hidróxido de Sodio, de las dos muestras y en los horizontes, a excepción del Oxisol HB, donde o se obtuvo suficiente muestra para la caracterización; se presenta un comportamiento diferente al de los extraídos con tetraborato y pirofosfato de Sodio, pero similar entre ellos. Aquí se observan solo dos fracciones indicando que las moléculas presentes en estas extracciones eluyen más rápido, es decir son mayor tamaño molecular, por lo tanto más complejas y condensadas, lo que correlaciona con los valores bajos en la relación E_4/E_6 de la tabla 16.

Los valores de Kav de la tabla 17, que resultan de la relación entre la máxima absorción de cada banda, su respectivo volumen de elusión y volumen de columna, indican que entre más pequeño sea este valor para cada pico o fracción, sus moléculas son más grandes. Al comparar este valor en cada uno de los extractantes para todas las muestras se observa que para la primera fracción se tiene un valor menor al presente en las otras fracciones, lo que confirma que las moléculas de mayor peso molecular salieron en la primera fracción y que en este caso en general, presentan un mayor porcentaje.

Tabla 17. Resultados filtración a través de Sephadex G-25

Muestra	PORCENTAJES		Kav
ANDISOL HA T	Fracción 1	80.41	0
	Fracción 2	8.43	0.64
	Fracción 3	11.16	1
ANDISOL HA P	Fracción 1	70.82	0
	Fracción 2	17.48	0.47
	Fracción 3	11.71	1
ANDISOL HA NaOH	Fracción 1	89.86	0
	Fracción 2	10.14	1
ANDISOL HB T	Fracción 1	93.10	0
	Fracción 2	1.38	0.46
	Fracción 3	5.52	1
ANDISOL HB P	Fracción 1	85.95	0
	Fracción 2	4.70	0.6
	Fracción 3	9.35	1
ANDISOL HB NaOH	Fracción 1	84.01	0
	Fracción 2	15.99	1
OXISOL HA T	Fracción 1	62.61	0
	Fracción 2	29.10	0.42
	Fracción 3	8.28	1
OXISOL HA P	Fracción 1	37.60	0
	Fracción 2	31.14	0.41
	Fracción 3	31.27	1
OXISOL HA NaOH	Fracción 1	83.40	0
	Fracción 2	16.60	1
OXISOL HB T	Fracción 1	72.79	0
	Fracción 2	20.19	0.33
	Fracción 3	7.02	1
OXISOL HB P	Fracción 1	43.33	0
	Fracción 2	42.52	0.2
	Fracción 3	14.15	1

6.5.5. Análisis de Microscopía Retrográfica de los Ácidos Fúlvicos.

En el analizados Olympus B x 60 se realizaron las fotografías de los Ácidos Fúlvicos purificados con un aumento de 4 x 3.

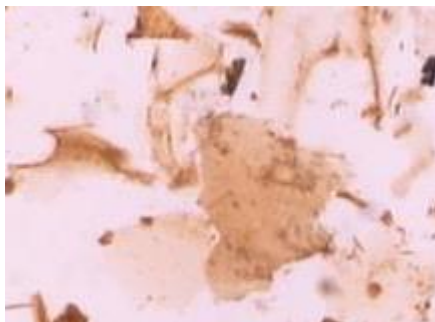


Figura 14. Imagen de Ácidos Fúlvicos del Andisol HA extracción con Tetraborato de Sodio con Microscopía Retrográfica.

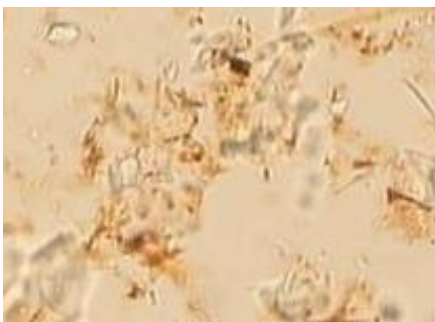


Figura 15. Imagen de Ácidos Fúlvicos del Oxisol HA extracción con Tetraborato de Sodio con Microscopía Retrográfica.

En las Figuras 14 y 15 se puede apreciar microscópicamente dos de las muestras de Ácidos Fúlvicos, las cuales son similares entre si, presentando un color amarillo característico de éstos Ácidos.

7. CONCLUSIONES

Se presentan grandes diferencias físicas y químicas entre los tipos de suelos, indicando la influencia del ecosistema y condiciones ambientales. El Oxisol es más meteorizado que el Andisol.

Se concluye que para la separación de la Materia orgánica Libre y Humificada es indispensable la combinación de los dos métodos, el granulométrico y el densimétrico.

Se logró la extracción de la humina heredada para los dos tipos de suelo, predominando en el Andisol.

El porcentaje de carbono de la Materia Orgánica Humificada es mayor en el Andisol horizonte A que en el horizonte B, en ambos tipos de suelos.

En el horizonte A de ambos tipos de suelos prevalecen entre la Materia Orgánica y la fracción mineral uniones tipo electrostático que son de fácil rompimiento por simple intercambio iónico se sustancias organominerales móviles, mientras que para el horizonte B del Andisol predominan uniones más fuertes entre la Materia Orgánica y la fracción mineral que indican un proceso de humificación mas consistente. En cambio, en el Oxisol horizonte B predominan las uniones de enlaces de coordinación entre la materia Orgánica y las arcillas.

Se deduce que es mejor la extracción secuencial con Tetraborato de Sodio, pirofosfato de Sodio e Hidróxido de Sodio, ya que cada uno de estos extractantes actúan sobre uniones diferentes.

Se comprobó que es mejor la purificación de AF utilizando sucesivamente la resina de adsorción Amberlita XAD-16, la resina de intercambio Rexyn 101 H y por último membrana de diálisis con base en los espectros IR e imágenes microscópicas visualizadas en un analizador de imágenes.

El contenido de Nitrógeno en los Ácidos Fúlvicos de ambos tipos de suelos es mínimo, y este elemento hallado en el análisis de materia orgánica humificada probablemente pertenece en su mayoría a la fracción de huminas y/o ácidos Húmicos.

Se encuentran diferencias entre el comportamiento estructural de los Ácidos Fúlvicos de los dos tipos de suelos, presentando los Ácidos Fúlvicos del Oxisol un mejor grado de condensación y polimerización y por tanto mayor complejidad en sus moléculas, lo que indica la influencia de las condiciones ambientales y su interacción con el tipo de suelo.

La filtración por sephadex G-25 muestra que los dos tipos de suelos existen tres fracciones características en los Ácidos Fúlvicos, predominando la primera fracción correspondiente a pesos moleculares mayores de 5000, con predominio de grupos OH fenólicos y menor contenido de grupos COOH.

Los valores de la relación E_4/E_6 y de acidez total de grupos COOH y OH muestran que los Ácidos Fúlvicos extraídos de los Oxisoles son mas complejas que las extraídas de los Andisoles. Se concluye, por lo tanto que si hay diferencias estructurales entre ellos.

8. BIBILIGRAFIA

1. PRIMAVESI, Ana. Manejo ecológico del suelo. Traducción de la quinta edición. Editorial el Ateneo, Costa Rica, 1982, p 95-111.
2. www.infoagro.com
3. VARSHOVI, A.; SARTAIN, J. Chemical characteristics and microbial degradation of humate. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 24 (17 y 18):2493-2505. 1993.
4. ORTEGA, F. La materia orgánica de los suelos y el humus de los suelos de Cuba. Instituto de suelos. Editorial Academia. 1982.
5. CEGARRA, J. Fraccionamiento de fertilizantes orgánicos y de sus productos de humificación. Centro de Edafología y Biología aplicada del Segura. Murcia, España. 1978.
6. GARCIA, C. ; CACCANTI, B. Fractionation and characterization of humic substance fractions with different molecular weights, obtained from animal wastes. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 41(4):649-658. 1995.
7. KIMURA, M.; WATANABE, A. Origin and properties of humus in the subsoil of irrigated rice paddies. *Soil Sci. Plant. Nutr.* 44 (3):331-345. 1998.
8. ZALBA, P.; QUIROGA, A. Fulvic acid carbon as a diagnostic feature for agricultural soil evaluation. *Soil Science.* 164 (1):57-61. 1999.
9. Suelos de Colombia. Instituto Geográfico Agustín Codazzi. Subdivisión de Agrología. Bogotá, 1995.
10. ORLOV, D. Humus Acids of soil. Editorial Balkema Rotterdam, India. 1986. p 179-208
11. LOBARTINI, J.; TAN, K. Composition of humic acids extracted under air and nitrogen atmosphere. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 22 (9 y 10):861-877. 1991.

12. STEVENSON. Chemistry of humus: Genesis, composition, reactions. New York, Ed. John Wiley y Sons. 1982, p 17-99.
13. <http://www.liveearth.com>.
14. VELASCO, F. MINGO, P. Distribución de la materia orgánica libre y ligada, y de las fracciones de humina en suelos climáticos y suelos degradados. Anales de Edafología Agrobiología. Diciembre de 1980. Página 179-189.
15. FUJIKATE, N.; KUSUMOTO, A. Properties of soil humic substances in fractions obtained by sequential extraction with pyrophosphate solutions at different pHs. Soil Sci. Plant. Nutr. 44 (2):253-260. 1998.
16. Métodos Analíticos del Laboratorio de Suelos. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi", 5ta edición. Subdivisión de Agrología. Bogotá, Colombia. 1990. Página 455-499.
17. BARRAGÁN, C.; URIBE, M. Selectividad de tres agentes extractantes tetraborato de sodio, pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio en la extracción de sustancias húmicas en suelos de la amazonia. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Departamento de Ciencias de la Educación. Proyecto curricular de Licenciatura en Química. Santa fe de Bogotá. 1999.
18. GUETZLOFF, F.; RICE, J. Fractionation of pesticide residues bound to humin. Soil Science. 162 (6):421-429. 1997.
19. CHEFETZ, B.; HATCHER, P. Characterization of dissolved organic matter extracted from composted municipal solid waste. . Soil Science Society American Journal. 62 : 326-332. 1998.
20. <http://www.engg.ksu.edu/HSRC/96proceed/khol/pdf>
21. CIAVATTA, C; SEQUI, P. Characterization of humified compounds by extraction and fractionation on solid polyvinylpyrrolidone. Journal of Chromatography. 509:141-146. 1990.
22. DORADO, E.; ALMENDROS, G. Extracción y caracterización de las sustancias húmicas en las fracciones físicas del suelo. Real sociedad Española de la Historia Natural. 77 : 5-28 1979
23. GERASIMOWICZ, W.; BYLER, D. Carbon-13 CPMAS NMR and FTIR spectroscopic studies of humic acids. Soil Science 139 (3):270-278. 1985.
24. ARANGO, G y GONZALEZ, H. Sustancias Húmicas formadas durante la Compostación de Residuos de Cosecha. Universidad Nacional – Sede Medellín. Instituto de Ciencias Naturales y Ecología. 1998

25. ANDREUX, Francis. Técnica de extracción y de caracterización de la materia orgánica del suelo. Misión Francesa de Cooperación Técnica. Instituto Geográfico "Agustín Codazzi", Bogotá, Colombia.
26. ALMENDROS, G. Evidence for a Polyalkyl nature of soil humin. *Naturwissenschaften* 78:359-362. 1991.
27. RIBEIRO, M.; ERTEL, J. Dissolved humic substances of the Amazon River system. *Limnology and Oceanography*. 31 (4):739-754. 1986.
28. LOBARTINI, J.C.; TAN, K.H. Humic matter isolated from soils and water by the XAD-8 resin and conventional NaOH methods. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 20 (13 y 14):1453-1477. 1989.
29. LOBARTINI, J.C.; HIMMELSBACH, D.S.. The significance of solid-state ^{13}C NMR Spectroscopy of whole soil in the characterization of humic matter. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 23 (13 y 14):1513-1532. 1992.
30. FERRARI, G. Molecular sizes and functional groups of humic substances extracted by 0.1M pyrophosphate from soil aggregates of different stability. *Journal of soil science*. 22 (3):342-349. 1971.
31. KUMADA, K. Chemistry of soil organic matter. Developments in soil science. Japan Scientific Societies Press. Japan. 1987.
32. SCHNITZER, M.; KODAMA, H. Mineral effects on the pyrolysis-field ionization mass spectrometry of Fulvic Acid. *Soil Science Society American Journal*. 58 : 1100-1103. 1994.
33. SHIN, H.; MOON, H. An "Average" structure proposed for soil fulvic acid aided by DEPT/ ^{13}C NMR pulse techniques. *Soil Science*. 161 (4):250-256. 1996.
34. PRESTON, C. ; RIPMEESTER, J. A spectropic and chemical investigation on the De-ashing of a Humin. *Soil Science Society American Journal*. 53 : 1442-1447. 1989.
35. FERRARI, G. Fractionation of the organic matter of soil by gel filtration through sephadex. University of Padua. Italia. 418-421. 1983.
36. GALLARRO, J. El humus. *Innovación y Ciencia*. 46 : 8-16. 1980.
37. YOUNG, Catherine. Glass transition behavior in peat Humic Acid and Aquatic Fulvic Acid. *Environ. Sci. Technol.* 34 4549-4553. 2000.
38. BROWN, J. ; MARTINEZ, A. Imaging of Humic Substance Macromolecular Structures in Water and Soils. *Science*. 286 : 1335-1337. Nov. 1999.

39. Simpson, Andre. Multidimensional Solution state NMR of Humic Substances: A practical guide and review. Soil Science. 166 (11): 1-13. Nov 2001.
40. CHEN, Y. ; SENESI. Information Provided on Humic Substances by E₄/E₆ ratios. Soil Science Society American Journal. 41 : 352-357. 1977.
41. RUIZ, M. ; ELIZALDE; G. Caracterización de las Sustancias Húmicas presentes en microagregados de Suelos de dos Toposecuencias. Agronomía Tropical 47 (4) : 381-395. 1997.
42. NIEMEYER, J. ; CHEN, J. Characterization of Humic Acids, Compost, and Peat by Diffuse Reflectance Fourier-Transform Infrared Spectroscopy. . Soil Science Society American Journal. 56 : 135-140. 19727.
43. ARANGO, G. Caracterización Química y Pedogenésis de suelos y Paleosuelos derivados de cenizas volcánicas en el norte de la cordillera Central Colombiana. Trabajo de grado. Universidad de Antioquia. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. 1993.
44. GUERRERO, R. Fertilización de Cultivos en clima frío. Monómeros Colombo Venezolanos. Capítulo 8.
45. BRAVO. I. GIRALDO; E. Manual de prácticas Agrícola: Análisis de Suelos. Universidad del Cauca. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación, Departamento de Química.

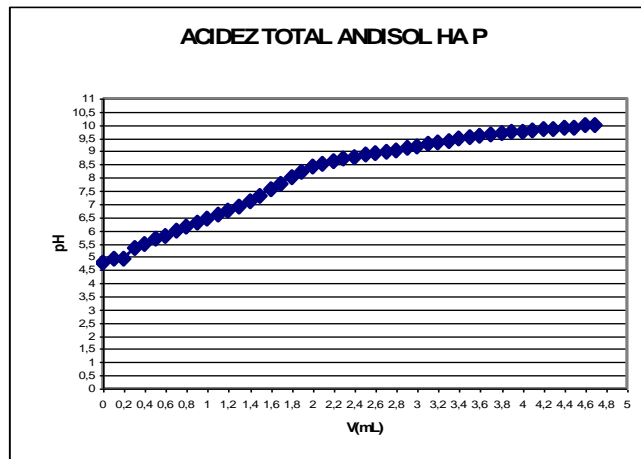
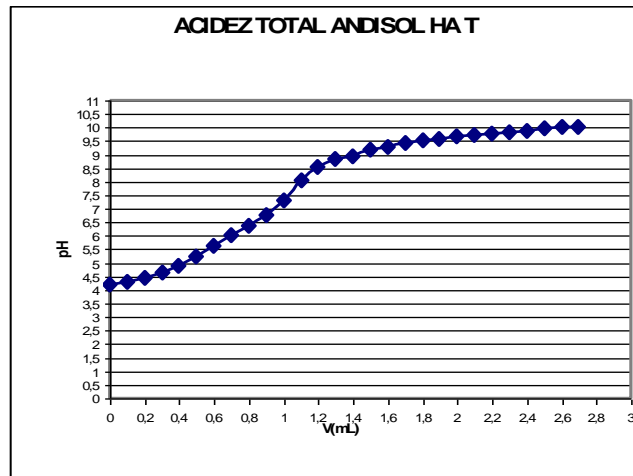
9. RECOMENDACIONES

Para próximos trabajos con sustancias Húmicas, en especial con Ácidos Fúlvicos, se sugiere complementar el estudio con otros análisis de caracterización.

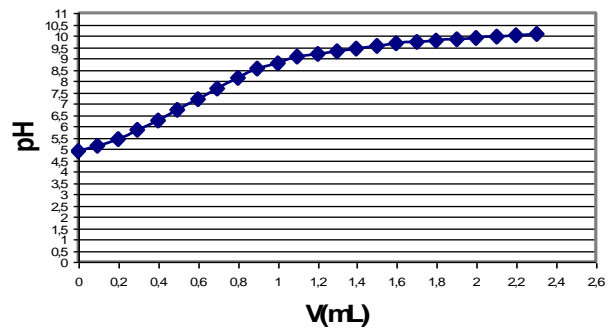
Además para la filtración con gel sephadex, se sugiere realizar el fraccionamiento con sephadex tipo G-50 y G-15, con el objeto de clasificar en un rango mas estrecho el peso molecular de los Ácidos Fúlvicos.

10. ANEXOS

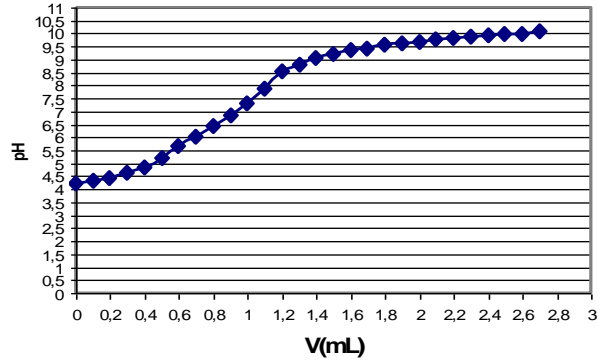
A. Curvas de Titulación de Acidez Total de todas las muestras.



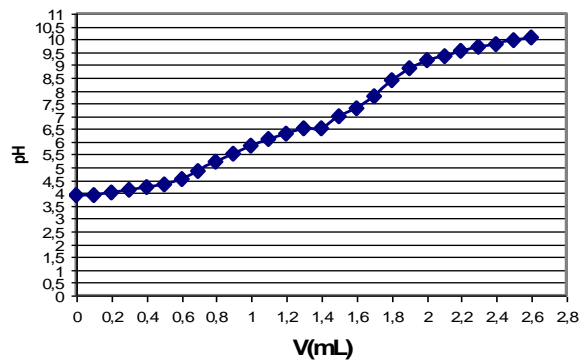
ACIDEZ TOTAL ANDISOL HA Na

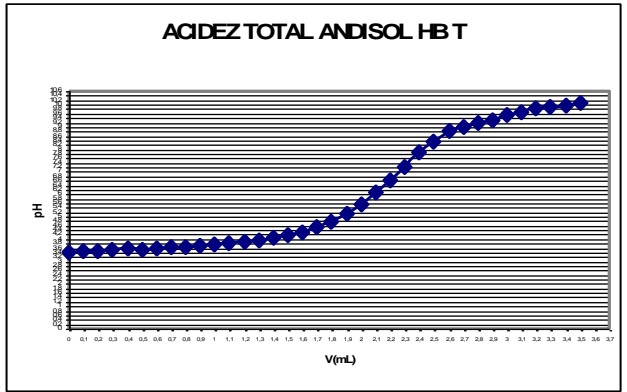
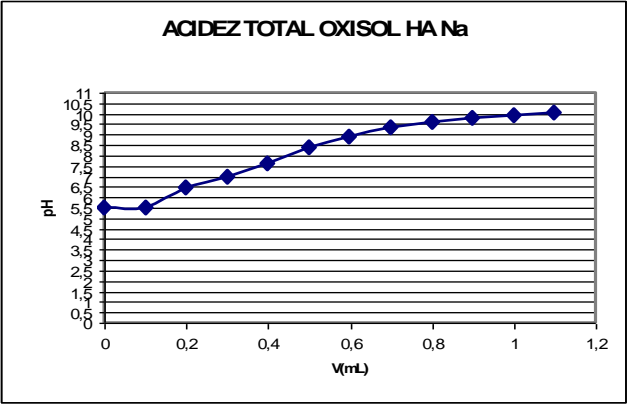


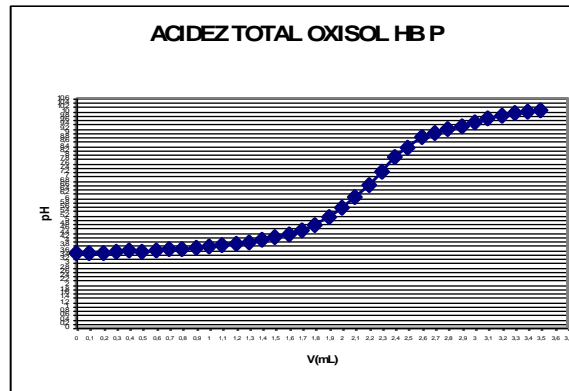
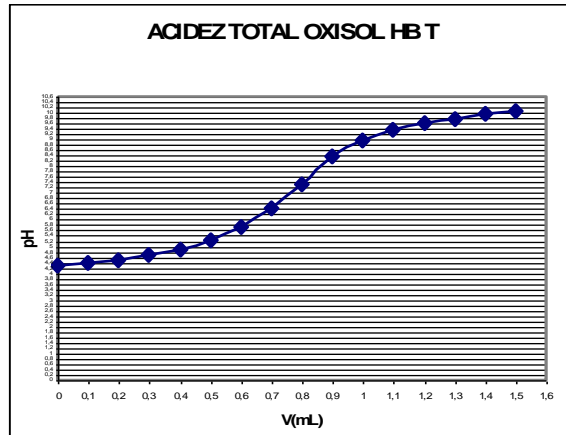
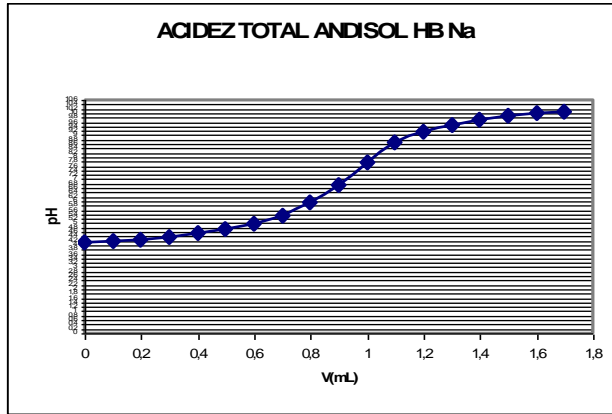
ACIDEZ TOTAL OXISOL HA T



ACIDEZ TOTAL OXISOL HA P







Anexo B Perfiles de elución sephadex G-25

