

**COMPORTAMIENTO ESTRUCTURAL DE LOS ÁCIDOS HÚMICOS
OBTENIDOS DE UN SUELO ANDISOL DEL DEPARTAMENTO DEL CAUCA****STRUCTURAL BEHAVIOUR OF HUMIC ACIDS FROM CAUCA
DEPARTMENT ANDISOL SOIL****COMPORTAMENTO ESTRUTURAL DOS ÁCIDOS HÚMICOS OBTIDOS
DE UM SOLO ANDISOL DO DEPARTAMENTO DO CAUCA**

Carmen S. Mosquera¹, Isabel Bravo¹ y Eddy W. Hansen²

Recibido: 14/12/06 – Aceptado: 13/04/07

RESUMEN

Las sustancias húmicas del suelo constan de una mezcla heterogénea de compuestos, en la que cada fracción (ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas) está constituida por moléculas de tamaños diferentes, y su estructura depende considerablemente tanto de los materiales orgánicos presentes en el suelo, como de las diferentes condiciones ambientales. Este estudio empleó técnicas de espectroscopía ultravioleta – visible (relación E4/E6), infrarroja con transformada de Fourier y resonancia magnética nuclear ¹³C (RMN) para identificar la estructura química de una muestra de ácidos húmicos (AH) provenientes de un suelo agrícola del departamento del Cauca, y los cambios que dicha estructura presenta en diferentes medios de reacción, como en anhídrido acético y alcohol absoluto. Los AH se obtuvieron a partir de la materia orgánica del suelo, mediante una separación granulométrica del

suelo y una extracción sucesiva empleando tres soluciones básicas: tetraborato de sodio (0,05M), pirofosfato de sodio (0,05M) e hidróxido de sodio (0,1M), purificándolos a través de tratamientos ácidos HCl-HF 1 %, centrifugación de alta velocidad y diálisis. La relación E4/E6 mostró cambios en el grado de condensación de los AH en los diferentes medios de reacción, corroborándose dichos cambios por el apareamiento de nuevas bandas o disminución y aumento de otras en los espectros infrarrojos, y por los cambios apreciables en las bandas y en la distribución de la intensidad en las diferentes regiones de los espectros de resonancia magnética nuclear ¹³C. Esta investigación muestra cambios químicos y estructurales de los ácidos húmicos extraídos de un suelo agrícola, que concuerdan con diferentes investigaciones efectuadas en este campo.

1 Departamento de Química, Universidad del Cauca, Ciudad Universitaria, Popayán. carmencita.mosquera@gmail.com, ibravo@unicauca.edu.co

2 Departamento de Matemáticas y Ciencias Naturales, Universidad de Oslo, Noruega.

Palabras clave: ácidos húmicos, resonancia magnética nuclear, relación E4/E6, materia orgánica, materia orgánica humificada, espectroscopía infrarroja y espectroscopía ultravioleta – visible.

ABSTRACT

Humic substances are a heterogeneous mixture of chemical compounds, where each fraction (humic acids, fulvic acids and humin) is constituted by different size molecules. Their structure depends on soil type and environmental conditions. In this study different spectroscopic techniques such as: ultraviolet-visible (ratio E4/E6), infrared Fourier transform (IFT) and solid – state ^{13}C nuclear magnetic resonance (NMR) have been used to identify the humic acids (HA) chemical structure, as well as the structural changes taking place in acetic anhydride and absolute ethanol. HA was extracted from organic matter of an Andisol soil in Cauca Department, Colombia, using three basic solutions: $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,05M), $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ (0,05M) and NaOH (0,1M). Humic acids were purified by acid treatment, HCl – HF 1%, high speed centrifugation and dialysis. The ratio E4/E6 revealed changes on humic acids condensation degree in different chemical environment. These changes were documented by the appearance of new bands and also as changes in relative signal intensity distribution of existing bands in the infrared spectra. Differences in relative intensity distribution of the solid state ^{13}C MAS NMR resonance bands were noticed. The present work reveals chemical and structural changes of HA obtained from an agricultural soil, and this study is

concordant respect to other studies made in this field.

Key words: humic acids, nuclear magnetic resonance, ratio E4/E6, organic matter, organic humified matter and ultraviolet – visible spectroscopic.

RESUMO

As substâncias fúmicas do solo constam de uma mistura heterogênea de compostos, onde cada um deles (ácidos fúmicos, ácidos fúlvicos e húminas) está constituído por moléculas de diferentes tamanhos, e a sua estrutura depende consideravelmente dos materiais orgânicos presentes no solo, assim como das diferentes condições ambientais. Para esta pesquisa utilizou-se técnicas de espectroscopia ultravioleta – visível (relação E4/E6), infravermelho com transformada de Fourier (ITF) e ressonância magnética nuclear (RMN) para identificar a estrutura química de uma mostra de ácidos fúmicos (AF) proveniente de um solo agrícola do Departamento do Cauca, e as mudanças que a estrutura apresenta nos diferentes meios de reação, anidrido acético e álcool absoluto, entre outros. Os ácidos fúmicos obtiveram-se a partir da matéria orgânica do solo, mediante separações granulométricas e extração sucessiva usando três soluções básicas: tetraborato de sódio (0,05M), pirofosfato de sódio (0,05M) e hidróxido de sódio (0,1M), purificando-os através de tratamentos ácidos HCl-HF 1%, centrifugação em alta velocidade e diálise. A relação m E4/E6 mostrou câmbios no grau de condensação dos AF nos diferentes meios de reação corroborando-se tais mudanças pelo aparecimento de novas bandas ou diminuição e aumento de outras nos espectros de infravermelho, e pelas mudanças apreciáveis nas sinais e distribuição da

intensidade nas diferentes regiões dos espectros de ressonância magnética nuclear. Observaram-se mudanças químicas e estruturais dos ácidos fúmicos extraídos de um solo agrícola, que concordam com diferentes pesquisas realizadas neste tema.

Palavras chave: ácidos fúmicos, ressonância magnética nuclear, relação E4/E6, matéria orgânica fumificada, espectroscopia infravermelha e espectroscopia ultravioleta-visível.

INTRODUCCIÓN

La materia orgánica (MO) se define como "la fracción orgánica del suelo que incluye residuos vegetales y animales en diferentes estados de descomposición, tejidos y células de organismos que viven en el suelo y sustancias producidas por los habitantes del suelo". En esta definición –aceptada por muchos edafólogos–, el concepto de materia orgánica es una categoría muy amplia que incluye tanto a materiales muy poco alterados como aquellos otros que si han experimentado profundos cambios en el suelo (1). La composición química, estructura y conformación de la MO puede variar inmensamente dependiendo del origen y la edad de los materiales presentes en ella, encontrándose por ejemplo, que los ácidos húmicos de diferentes suelos han dado diferentes composiciones y estructuras químicas (2).

Los ácidos húmicos, como parte fundamental en el mantenimiento y mejoramiento de las propiedades físicas, biológicas y químicas del suelo, ha motivado a miles de investigadores en el conocimiento de su estructura y su relación con el transporte y la retención de contaminantes orgánicos e inorgánicos. Se plantea

que son macromoléculas aromáticas complejas con amino-ácidos, amino-azúcares, péptidos y compuestos alifáticos que están involucrados en las uniones entre los grupos aromáticos. La estructura hipotética para los ácidos húmicos contiene grupos fenólicos libres y enlazados, estructuras de quinonas, nitrógeno y oxígeno como puentes y grupos de ácidos carboxílicos en varios lugares de los anillos aromáticos (3); además son moléculas en las que se observa la presencia de anillos aromáticos del tipo di y trihidroxibenceno y el nitrógeno como componente estructural que indica la presencia de residuos de carbohidratos y proteínas (4). Otros autores sostienen que los AH son mezclas de los carbohidratos, proteínas y lípidos procedentes tanto de las plantas como de origen microbial, junto con degradaciones parciales de lignina y taninos, y con materiales microbiales como las melanimas (5), o son pseudo estructuras definidas como constituciones moleculares hipotéticas con elementos, estructuras y grupos funcionales parecidos y consistentes con algo o todas las propiedades observadas de una mezcla dada, las cuales no son estructuras moleculares, ni son estructuras promedio o un modelo promedio estructural (6).

El desarrollo de las diferentes técnicas espectrales –como la espectroscopía ultravioleta-visible, infrarroja con transformada de Fourier, resonancia magnética nuclear ^{13}C – ha permitido avanzar considerablemente en el estudio y entendimiento de la estructura de los ácidos húmicos y, por ende, en el estudio y entendimiento de sus funciones y relaciones en el suelo con los nutrientes y contaminantes (7-10). Esta investigación se desarrolla con el fin de determinar, me-

dianter varias técnicas espectroscópicas y analíticas, los cambios estructurales y químicos de los ácidos húmicos en diferentes medios de reacción, y de este modo obtener una información estructural correspondiente a los AH de un suelo Andisol del departamento del Cauca, Colombia, para compararla con estudios que se han llevado a cabo en otros países y tipos de suelos, e igualmente con el propósito de contribuir a la elucidación de su estructura y funciones en el suelo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Extracción y purificación de los AH

Las muestras de suelo se recolectaron en una unidad de muestreo trazada en una finca de la vereda La Aurelia, municipio de Cajibío, departamento del Cauca, a 1.740 metros sobre el nivel del mar, a una profundidad de 30 cm. Para obtener la MOH, se suspende suelo seco y tamizado por malla de 2 mm en agua, en relación 18:100, agitando la suspensión durante 16 horas en presencia de bolas de cristal. La suspensión se somete a separación granulométrica en húmedo en un tamizador eléctrico; la fracción menor a $53\mu\text{m}$ corresponde a la MOH. Para obtener los ácidos húmicos se hacen extracciones sucesivas de la MOH con tres soluciones básicas: 0,05M de $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y 0,1M de NaOH, usando los procedimientos recomendados por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas y estandarizados en el Laboratorio de Agroquímica de la Universidad del Cauca (11, 12). Los sobrenadantes de estas extracciones, en donde se encuentran las fracciones de ácidos húmicos y ácidos fúlvicos, se someten a trata-

miento con sulfato de sodio para flocular las arcillas ligadas a dichas fracciones, y a continuación se separan mediante centrifugación a 6.000 rpm. Posteriormente se separan los ácidos húmicos mediante precipitación con H_2SO_4 concentrado, y centrifugación a 4.000 rpm. La purificación de los ácidos húmicos se realiza mediante la combinación de metodologías: centrifugación a alta velocidad (12.000 rpm), tratamiento con ácido clorhídrico-fluorhídrico para romper las uniones con compuestos inorgánicos, redisoluciones sucesivas en NaOH y diálisis por 24-48 horas, a través de membranas de celulosa de 12.000 daltons, hasta cambio de pH a valor ácido y eliminación de los cloruros. Por último se liofiliza la muestra con el fin de obtenerla en estado sólido para su posterior sometimiento a diferentes medios químicos y caracterización, se obtiene así la fracción denominada AH.

Acetilación de los AH

La muestra de AH se acetila por calentamiento y agitación constante en presencia de anhídrido acético y piridina, durante 24 h, evaporando posteriormente a 45°C en un rotavapor y disolviendo el residuo en una mezcla de H_2O y acetato de etilo (modificando la metodología empleada por Almendros y cols. (7)). Se obtienen tres fracciones: AH_1 soluble en acetato de etilo, AH_2 soluble en agua y AH_3 insoluble en la mezcla. El compuesto AH_3 se disuelve en NaHCO_3 al 5%, obteniéndose dos fracciones AH_{3A} y AH_{3B} ; AH_{3B} se fracciona por su solubilidad en agua en AH_{3B1} y AH_{3B2} .

Tratamiento con etanol absoluto

La muestra de AH se trata con etanol absoluto durante 12 h; se evapora posteriormente en baño María a 45 °C, y así se obtiene la muestra AH₅.

Caracterización de los AH y los productos de las diferentes reacciones

La relación E4/E6 se determinó por métodos estándar, disolviendo 0,001 g de muestra en 10 mL de NaHCO₃ 0,05M y leyendo la absorbancia a 465 y 665 nm (13).

Los espectros infrarrojos se tomaron en un FTIR ATIMATTSON de resolución 4000 a 400 cm⁻¹ formando una pastilla con 0,001 g de la muestra y 0,100 g de KBr (8).

Los espectros de resonancia magnética nuclear ¹³C fueron obtenidos con un espectrofotómetro Bruker DMX 200 con CPMAS, una rampa de polarización durante el tiempo de contacto y un desacople protónico durante la adquisición. El número de escanes 32K, tiempo de contacto 2 ms, anchura del barrido 1530Hz, 90° pulso rf, 2,2μs de longitud y un tiempo de adquisición de 67 ms. Todas las medidas fueron obtenidas a temperatura ambiente, 25 °C y empleando acetona como solvente [modificando la metodología empleada por Kang y cols. (17) y Cheftz y cols., (9)].

RESULTADOS Y ANÁLISIS

Relación E4/E6

El valor de la relación E4/E6 (ver Tabla1) de la fracción AH se encuentra dentro del rango reportado por Kokonova (14), e indica que los ácidos húmicos tienen una estructura donde el carbón no está totalmente

haciendo parte de grupos altamente conjugados, como los anillos aromáticos (13), y posiblemente corresponde o hace parte de un humus, en el que hay una gran presencia de grupos alifáticos que configuran el cuerpo estructural de los ácidos húmicos.

La diferencia entre los valores de la relación E4/E6 muestra los distintos grados de condensación del carbón presente en las moléculas de ácidos húmicos, evidenciando un aumento de estructuras alifáticas en el compuesto AH₃ respecto al compuesto AH, posiblemente por la acetilación de los grupos OH y los grupos -CH₂OH, presentes en la estructura.

El compuesto AH_{3A}, presentó una relación mayor respecto al compuesto AH₃, mientras que el compuesto AH_{3B1} manifestó una relación menor, lo cual indica posiblemente que las moléculas de AH₃ al

Tabla 1. Relación E4/E6 de los ácidos húmicos y sus productos de reacción.

Muestra	Identificación	Relación E4/E6
AH	Ácidos húmicos purificados	4,64
AH ₃	Producto de la acetilación insoluble en la mezcla	5,36
AH _{3A}	Soluble en NaHCO ₃ al 5%	7,17
AH _{3B1}	Insoluble en NaHCO ₃ al 5% y soluble en H ₂ O	3,80
AH ₅	Producto del tratamiento con etanol absoluto	4,81

solubilizarse en NaHCO_3 (hidrólisis básica) sufrieron un rompimiento a través de sus enlaces electrostáticos o enlaces con presencia de grupos éster, produciendo moléculas en donde los anillos aromáticos estén en menor cantidad (AH_{3A}) y moléculas más simples, con presencia de muy pocos anillos aromáticos u otras formas del carbón que influyen en el valor de la relación E4/E6 (AH_{3B1}).

En el tratamiento con etanol absoluto se observó un leve incremento en el valor de la relación E4/E6, debida posiblemente a un aumento de las estructuras alifáticas en el cuerpo estructural de los AH.

Análisis espectros IR

La espectroscopía infrarroja ha sido ampliamente usada para la caracterización de las sustancias húmicas, y puede proveer información valiosa sobre las propiedades funcionales y estructurales de la materia orgánica del suelo (8, 15, 16, 17).

Los espectros IR de los AH y sus diferentes productos después de la acetilación y el tratamiento con etanol absoluto se presentan en la Figura 1. La banda ancha y fuerte entre $3.560 - 3.200 \text{ cm}^{-1}$ es causada por la vibración de estiramiento del hidrógeno unido al OH con enlace probablemente de H intermolecular que corresponde a un sistema polimérico. También puede aparecer en esta región el N-H libre asoci-

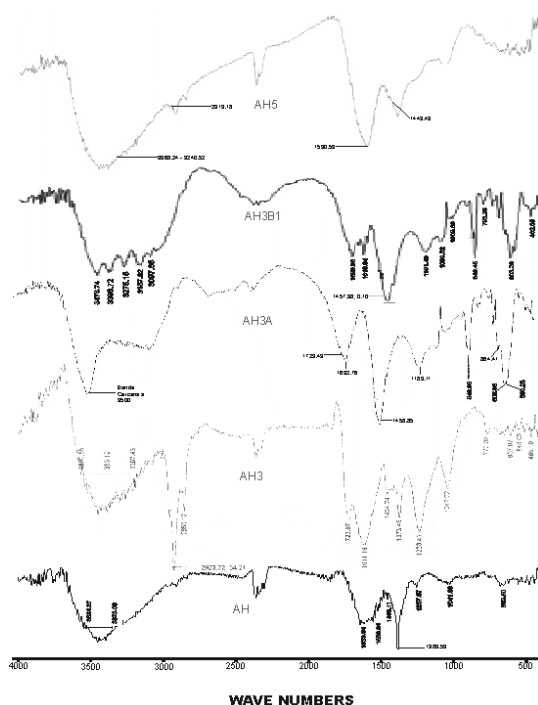


Figura 1. Espectros IR de los compuestos AH, AH_3 , AH_{3A} , AH_{3B1} y AH_5 .

do por enlaces de hidrógeno, banda generalmente solapada con la tensión de OH. La banda débil a $3.047,72\text{cm}^{-1}$ en el compuesto $\text{AH}_{3\text{BI}}$ es característica de los grupos C-H aromáticos (8, 17). Las bandas a $2.923,22$ y $2.853,12\text{cm}^{-1}$, $2.919,18\text{cm}^{-1}$ en los compuestos AH_3 y AH_5 , respectivamente, describen estiramiento asimétrico ($2.923,22$ y $2.919,18\text{cm}^{-1}$) y simétrico ($2.853,12\text{cm}^{-1}$) de los grupos alifáticos CH_2 . Estas bandas se observan solamente en los espectros de dichos compuestos, sugiriendo que los tratamientos con anhídrido acético y etanol aportan estructuras alifáticas a los AH y son más fuertes en el espectro del compuesto AH_3 . La banda débil entre 1.723 - 1.692cm^{-1} es el resultado de la tensión $\text{C}=\text{O}$, principalmente de COOH (15), y se encuentra únicamente en los espectros de los compuestos concernientes a la acetilación, corroborando que sí se llevó a cabo dicha reacción. La banda aguda y fuerte entre 1.633 - 1.590cm^{-1} puede ser asignada al estiramiento aromático $\text{C}=\text{C}$ y/o al estiramiento asimétrico de grupos carboxílicos ionizados (17); se observa un incremento y una disminución en el %T que posiblemente puede indicar una disminución y un incremento, respectivamente, en la concentración de los anillos aromáticos, evidenciando la heterogeneidad de los ácidos húmicos y el rompimiento de los enlaces electrostáticos o covalentes, para generar moléculas aromáticas más simples. La banda entre 1.453 - 1.459cm^{-1} corresponde a la deformación de grupos alifáticos C-H y grupos O-H, y al estiramiento de O-H fenólicos (16), en donde hay un aumento en la intensidad de las bandas (disminución del %T), en los compuestos $\text{AH}_{3\text{A}}$ y $\text{AH}_{3\text{BI}}$. La banda delgada y fuerte a $1.383,53\text{cm}^{-1}$ en el compuesto AH pue-

de ser asignada a las flexiones de los O-H fenólicos presentes en la estructura, mientras que la banda moderadamente fuerte a $1.373,45\text{cm}^{-1}$ en el compuesto AH_3 detecta la presencia de grupos metilo correspondiente a una flexión simétrica. Una banda entre 1.257 y 1.230cm^{-1} en los compuestos AH y AH_3 , es atribuida al estiramiento C-O, deformación del OH del COOH y estiramiento C-O de aril éteres (17). Las bandas a $1.189,11$ y $1.191,48\text{cm}^{-1}$, de intensidad media, en los compuestos $\text{AH}_{3\text{A}}$ y $\text{AH}_{3\text{BI}}$, respectivamente, corresponde a las vibraciones C-O de grupos como polisacáridos, éster, éter o alcohol y vibraciones O-H de los alcoholes (8). Las bandas de diferentes intensidades cercanas a 1.074cm^{-1} y a 600cm^{-1} son asignadas al estiramiento de polisacáridos y/o a uniones de componentes polisacáridos o impurezas de silicatos Si-O y los picos y las vibraciones asociadas, a compuestos minerales desconocidos (por ejemplo, silicatos u óxidos), respectivamente (17).

Análisis ^{13}C -RMN

Los resultados de los análisis de ^{13}C -RMN para los compuestos AH y AH_3 son presentados en la Figura 2 y en la Tabla 2. Los ácidos húmicos extraídos del suelo Andisol del departamento del Cauca presentaron cinco bandas bien definidas: la primera, entre $20,0$ - $40,0$ ppm de mayor intensidad; la segunda banda entre $50,0$ - $60,0$ ppm; la tercera entre $70,0$ - $80,0$ ppm, la cuarta entre $120,0$ - $140,0$ ppm y la quinta entre $170,0$ - $180,0$ ppm, las cuales corresponden a carbonos alifáticos o parafínicos, grupos metoxi, grupos $-\text{CH}_2\text{O}$, grupos aromáticos y grupos carboxílicos o

grupos fenólicos, respectivamente. La mayoría de las bandas fueron consistentes con las diferentes investigaciones realizadas sobre la materia orgánica del suelo (17, 18, 19). La fracción AH₃ correspondiente a los ácidos húmicos acetilados presentó diferencias notables frente al compuesto AH, porque las bandas son más definidas, y en la región de 10,0 - 40,0 ppm aparece una nueva banda de intensidad considerable. Se encuentran seis bandas bien definidas para el compuesto AH₃: dos bandas en la región de 10,0 - 40,0 ppm, correspondientes a carbonos alifáticos, posiblemente CH₃ o carbonos parafínicos; en la región de 50,0 - 60,0 ppm se observa una banda muy débil correspondiente a los grupos metoxi; en la región de 60,0 - 90,0 ppm hay una banda correspondiente a los grupos - CH₂O; en la región de 110,0 - 140,0 ppm hay una banda ancha correspondiente a los grupos aromáticos, y en la región de 160,0 - 180,0 ppm hay una

banda intensa correspondiente a los grupos carboxílicos presentes en los ácidos húmicos acetilados. Además se observa un hombro a 105,0 ppm del carbón anomérico de los carbohidratos y una pequeña banda a 152,0 ppm del oxígeno sustituido de los carbonos aromáticos (9, 17).

Hay una disminución de grupos aromáticos (región B), un aumento de grupos carboxílicos y alifáticos (región A y F, respectivamente) y una disminución no muy considerable de grupos metoxi (región D) en el compuesto AH₃, respecto al AH (ver Tabla 2).

La Figura 3 muestra el espectro ¹³C-RMN para el compuesto AH₅. Las bandas que se observan se pueden integrar en cinco: la primera entre 20,0 - 40,0 ppm, de mayor intensidad, la segunda banda entre 50,0 - 60,0 ppm; la tercera entre 70,0 - 80,0 ppm; la cuarta entre 120,0 - 140,0 ppm y la quinta entre 170,0 - 180,0 ppm, las cuales corresponden a

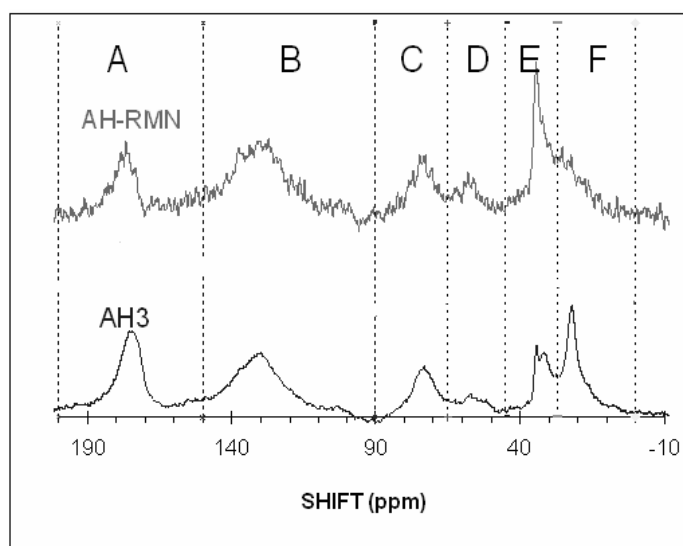


Figura 2. Espectros ¹³C-RMN de los compuestos AH y AH₃.

Tabla 2. Distribución de intensidad de ^{13}C -RMN de compuestos: AH, AH₃

Región	δ ppm	AH	AH ₃
A	200,0 - 150,0	18	26
B	150,0 - 90,0	33	29
C	90,0 - 75,0	11	10
D	75,5 - 45,0	8	6
E	45,0 - 38,0	17	11
F	38,0 - 0,0	12	17

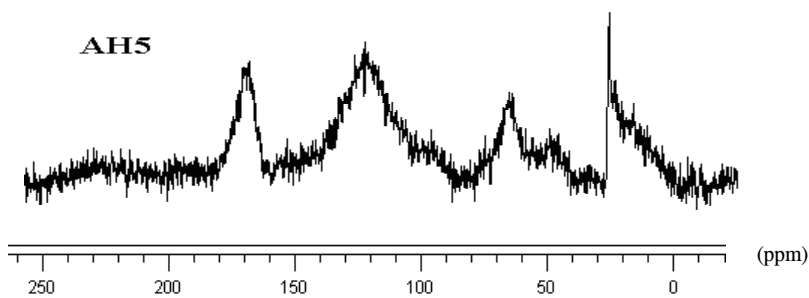
carbonos alifáticos o parafínicos, grupos metoxi, grupos $-\text{CH}_2\text{O}$, grupos aromáticos y grupos carboxílicos o grupos fenólicos, respectivamente, muy similar al espectro del compuesto AH, lo que permite inferir que los cambios sufridos a nivel estructural de los ácidos húmicos cuando son tratados con etanol absoluto, son mínimos o casi nulos respecto a los cambios sufridos en la acetilación. El tratamiento con etanol absoluto, de acuerdo con los espectros infrarrojos y ^{13}C -RMN solo produce un leve incremento de las estructuras alifáticas; por eso el leve incremento en el valor de la relación E4/E6 en el compuesto AH₅ respecto al compuesto AH.

Al comparar los desplazamientos químicos de las diferentes bandas obtenidas

en los espectros de ^{13}C -RMN con los trabajos realizados por otros investigadores en diferentes suelos, encontramos que los ácidos húmicos obtenidos presentan desplazamientos muy similares, evidenciando la presencia de los mismos grupos funcionales en la estructura de los AH, a pesar de las diferencias ambientales en el proceso de humificación (9, 17).

CONCLUSIONES

- De acuerdo con la espectroscopía infrarroja, los diferentes compuestos presentaron bandas en posiciones muy similares, pero con diferentes intensidades (%T) atribuible a cambios en la concentración de los diferentes grupos funcionales.
- Los resultados obtenidos en la acetilación permitieron observar una diversidad de moléculas en los ácidos húmicos y la presencia de estructuras químicas que se mantienen en su cuerpo estructural, con variaciones en sus grados de condensación.
- Según los espectros ^{13}C -RMN, los ácidos húmicos presentaron cinco bandas reiterativas correspondientes a: carbonos alifáticos, grupos metoxi, grupos

**Figura 3.** Espectro ^{13}C -RMN del compuesto AH₅.

-CH₂OH, grupos aromáticos, grupos fenólicos y carboxílicos.

- La estructura química de los ácidos húmicos del suelo analizado podría indicar moléculas en las que el carbón no corresponde a grupos altamente conjugados y posiblemente corresponde a un humus con proceso incipiente de humificación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Fassbender, H.; Bomernisza, E. Química de los suelos en énfasis en suelos de América Latina. Costa Rica, 1987, pp. 7, 11 y 121-124.
2. Chen, Z.; Pawluk, S. Structural variations of humics acids in two soils of Alberta mollisols. *Geoderma*. 1995, **65**: 173-193.
3. Ayhan, D. Characterization of humic substance from lignite samples. *Energy sources*. 2003, **25**: 23-32.
4. Stevenson, F. Cycles of soil carbon, nitrogen, phosphorus, sulfur, micronutrients. New York, USA: A Wiley – Interscience publication, 1985, pp. 1-42.
5. Burdon, J. Are the traditional concepts of the structures of humic substances realistic? *Soil Science*. 2001, **166** (11): 752-769.
6. MacCarthy, P. The principles of humic substances. *Soil Science*. 2001, **166** (11): 738-751.
7. Almendros, G.; Guadalix, M. E. González, F. J. Martín, F. Distribution of structural units in humic substances as revealed by multi-step selective degradations and ¹³C-NMR of successive residues. *Soil Biol Biochem*. 1998, **30** (6): 755-765.
8. Ribeiro, J.; Sonay, S.; Garrigues, S.; Guardia, M. F. Tentative characterization of humic acids extracted from organic materials. *Spectroscopy Letters*. 2001, **34** (2): 179-190.
9. Chefetz, B.; Tarchitzky, J.; Ashish P.; Hatcher, P. G.; Chen, Y. Structural characterization of soil organic matter and humic acids in particle-size fractions of an agricultural soil. *Soil Sci Soc Am J*. 2002; **66**: 129-140.
10. Jindong, M.; Weiguo, H.; Guangwei, D.; Klaus, S.; Geoffrey, D.; Elham, A.; Baoshan, X. Suitability of different ¹³C solid-state NMR techniques in the characterization of humic acids. *Inter J. Environ. Anal Chem*. 2002. **82** (4): 183-196.
11. Muñoz, B. Extracción y caracterización preliminar de huminas de un suelo Andisol del departamento del Cauca. Tesis de grado. Universidad del Cauca, Popayán, 2004, pp. 24-26.
12. Dávila, J. Caracterización preliminar de ácidos fúlvicos de dos suelos colombianos. Tesis de grado. Universidad del Cauca, Popayán, 2002, pp. 12-40.
13. Chen, Y.; Senesi, N.; Schnitzer, M. Information provided on humic substances by E4/E6 ratios. *Soil Sci Am J*. 1977. **41**: 352-358.
14. Kokonova, M. M. Soil organic matter. Oxford, U.K: Pergamon Press, 1966, pp. 400-404.

15. Baes, A. U.; Bloom, P. R. Diffuse reflectance and transmission Fourier transform infrared spectroscopy of humic and fulvic acids. *Soil. Sci. Soc Am J.* 1989. **53**: 695-700.
16. Niemeyer, J.; Chen, J.; Bollag, J. M. Characterization of humic acids compost, and peat by diffuse reflectance Fourier-transform infrared spectroscopy. *Soil Science. Am. J.* 1992. **56**:135-140.
17. Kang, S.; Amarasiriwardena, D.; Veneman, P.; Xing B. Characterization of ten sequentially extracted humic acids and humin from a soil in western Massachusetts. *Soil Science.* 2003. **168**(12): 880-886.
18. Cook, R. L.; Langford, C. H. A modified cross-polarization magic angle spinning ^{13}C NMR procedure of the study of humic materials. *Anal Chem.* 1996. **68**: 3979-3986.
19. Preston, C. M. Applications of NMR to soil organic matter analysis: history and prospects. *Soil Sci.* 1996. **161**: 144-166.

