

Una revisión útil y una aplicación interesante de la espectroscopía RMN.

Aplicación de la espectroscopía RMN de ^{13}C en la caracterización de la materia orgánica del suelo

Luciano Pasqualoto Canellas,¹ Gabriel de Araújo Santos,¹ Víctor Marcos Rumjanek² y Anselmo Alpande Moraes²

Summary

We show some examples on the uses of carbon-13 NMR spectroscopy, a technique initially developed by physicists and later by chemists, in the agronomic studies to characterize soil organic matter.

Resumen

En este artículo se muestran algunos ejemplos del uso de la técnica de resonancia magnética nuclear de ^{13}C , desarrollada en principio por los físicos y hoy con amplia aplicación en el campo de la química, en estudios agronómicos de la materia orgánica del suelo.

El suelo es un cuerpo vivo, tridimensional, reflejo de las condiciones ecológicas de su formación y de la forma en que se utiliza. Está compuesto, en su mayor parte, por una fracción mineral proveniente del intemperismo de la roca original y por una fracción orgánica oriunda de las transformaciones de los restos vegetales y animales depositados en la superficie terrestre. A pesar de representar una pequeña proporción (entre 1 y 5% en peso, en la mayoría de los suelos utilizados en la agricultura), la materia orgánica influye sobre una serie de propiedades químicas, físicas y biológicas importantes del suelo como el suministro de los nutrientes a las plantas, el almacenamiento del agua y el abastecimiento de sustrato para el crecimiento de los microorganismos. El manejo de la materia orgánica representa entonces la base de la fertilidad del suelo para una agricultura sostenible y ecológicamente limpia. Entretanto, dada la complejidad de las reacciones de los compuestos orgánicos del suelo, el conocimiento sobre la naturaleza química de los compuestos formados durante la transformación de los residuos orgánicos frescos y su transformación en compuestos del coloración oscura y elevado peso molecular (substancias húmicas), es todavía un desafío para los investigadores.

El uso de técnicas espectroscópicas, en particular de la

resonancia magnética nuclear (RMN), ha demostrado ser un mecanismo útil en la caracterización de la materia orgánica de los suelos. En este trabajo se discute la aplicación de la técnica de la RMN de ^{13}C , mostrando algunos ejemplos de su uso en Ciencias del Suelo a partir de la revisión de la literatura especializada y de algunos datos experimentales obtenidos por los autores. Para una rápida introducción a la técnica de la resonancia magnética nuclear se recomienda el artículo de Salas y Castolo (1997), y para una lectura más profunda los libros de Gil & Geraldés (1987) y Sanders & Hunter (1987). Sobre la aplicación de la RMN en materiales geológicos y en suelos, una visión bastante completa se encuentra en Wilson (1987) y más reciente en Preston (1996).

Como cualquier otra espectroscopía de absorción, la interacción entre la energía y la materia ocurre en el paso de un estado de menor energía hacia uno de mayor energía. En el caso de la RMN los estados energéticos corresponden a la orientación de los espines nucleares (en contra o a favor) en relación al campo magnético externo. La energía necesaria para provocar la transición se encuentra en la región de radiofrecuencias del espectro eletromagnético y es proporcional al campo aplicado y al ambiente químico del núcleo. Por ambiente químico debe entenderse la magnitud real del momento magnético del núcleo y la influencia de los núcleos vecinos que producen efectos electrónicos de protección y desprotección del campo eletromagnético que experimenta dicho núcleo (efecto inductivo por ejemplo).

Packard, en 1950-1951 observó la utilidad del fenómeno para la química y la bioquímica. A partir de 1953, después del primer equipo producido comercialmente, se observó un increíble salto tecnológico con la utilización de campos magnéticos homogéneos cada vez mayores, posibilitando un aumento tanto en la sensibilidad como en el poder de resolución. Con el uso de las técnicas de pulso y de la Transformada de Fourier en los años 70, la RMN comenzó a ser usada para la observación de estructuras moleculares cada vez más complejas. Es solamente al principio de los años 80 que aparecen los primeros artículos con la aplicación de la RMN en suelos usados para la agricultura, con los trabajos pioneros de Caroline Preston, Morris Schnitzer y Michael Wilson.

Una de las primeras cuestiones esclarecidas a través de la RMN de la materia orgánica del suelo está relacionada con

¹ Departamento de Suelos, Universidad Federal del Río de Janeiro, Seropédica (RJ) 23851-970, Brasil.

² Departamento de Química, Universidad Federal Rural del Río de Janeiro.

Recibido: 6 de mayo de 1998; Aceptado: 4 de diciembre de 1998.

los efectos del proceso de extracción. El principio de la extracción de la materia orgánica con álcalis y la precipitación de compuestos de coloración oscura con ácidos fuertes, llamados ácidos húmicos (del latín, *humus* = suelo), se inicia en el siglo XVIII con Achard (citado por Stevenson, 1994). A partir de entonces, la materia orgánica estabilizada en los suelos se clasifica operacionalmente en ácidos fúlvicos (solubles en medio alcalino), ácidos húmicos (insolubles en medio ácido) y huminas (insolubles tanto en medio alcalino como ácido). Según algunos autores, la extracción alcalina modifica la estructura de los compuestos orgánicos, promoviendo la auto-oxidación y la producción de compuestos colaterales (Bremner, 1950; Swift & Posner, 1972; Hayes *et al.*, 1975). El uso de la resonancia magnética nuclear en el estado sólido, con transferencia cruzada de polarización y rotación de la muestra en la orientación del ángulo mágico (RMN-CP/MAS), permite observar muestras intactas del suelo, sin pasar por la extracción y el fraccionamiento. Krosshavn *et al.* (1992) verificaron que la extracción y el fraccionamiento no tienen influencia en la composición química de la materia orgánica, y que la suma de los espectros obtenidos de las fracciones de la materia orgánica corresponde a los espectros obtenidos del suelo intacto. Resultados semejantes fueron verificados por Tan *et al.* (1992).

Tampoco es reciente el establecimiento de la relación que existe entre el contenido de materia orgánica en el suelo y la abundancia de las cosechas. Al principio de la era agrícola, las tierras oscuras con vegetación exuberante fueron las más utilizadas. Con la ocupación de la florestas después de su derrumbe, quema y a través de los cultivos sucesivos, el contenido de la materia orgánica disminuyó considerablemente y en algunos casos, los sistemas tropicales por ejemplo, la pérdida fue espantosa. Como consecuencia, la fertilidad natural del suelo disminuyó y aumentó la necesidad de usar abonos minerales y agrotóxicos. La disminución del contenido de materia orgánica en el suelo es consecuencia del menor aporte anual de los residuos orgánicos (retirada por la cosecha y quema de los residuos vegetales), del aumento de la erosión y de la oxidación de los compuestos del carbono. Sobre este último punto, durante muchos años se pensó que la oxidación de la materia orgánica tanto por los microorganismos del suelo como por las reacciones químicas, acontecía selectivamente: primero los compuestos más fácilmente degradables desaparecían permaneciendo en el suelo la fracción más resistente, *i.e.*, la que posee naturaleza aromática. Capriel *et al.* (1992) verificaron en experimentos de más de 30 años con cultivos agrícolas, que la degradación de la materia orgánica no es selectiva y la persistencia del material orgánico en el suelo está mucho más relacionado con su interacción con la fracción mineral que con su estructura química propiamente dicha. En esta

área la RMN no sólo ha ayudado a realizar el balance cuantitativo de las pérdidas del carbono en los diferentes tipos de cultivos, sino también ha permitido evaluar de forma rápida y segura las modificaciones cualitativas del material orgánico presente en el suelo.

Diversos trabajos de caracterización de la materia orgánica con RMN de ^{13}C han aparecido en la literatura especializada y la publicación del artículo de Preston & Schnitzer (1986) ha sido un gran impulso. En este trabajo fueron caracterizados 18 tipos diferentes de ácidos húmicos extraídos de los suelos de clima templado y se establecieron las condiciones de utilización de la RMN del ^{13}C en disolución y en muestras sólidas, lo que permitió la comparación de los resultados obtenidos por diferentes grupos de investigación. Esta información permitió clasificar los espectros dentro de tres regiones de desplazamientos químicos: la región de 0 a 106 ppm, correspondiente a la absorción del C en grupos alifáticos, 106 a 166 ppm correspondiendo a la absorción del C en grupos aromáticos, y de 166 a 200 ppm relativos a la absorción del grupos CO_2H . Las medias de los resultados indicaron la presencia de 40.9% del C alifático en los ácidos húmicos y 35.9% de C aromáticos. El grado de aromaticidad (cociente del área correspondiente a la región de 106 a 166 ppm entre el área correspondiente a la región de 0 a 166 ppm) fue de 46.8%. Este índice ha sido utilizado como parámetro para estudios de caracterización de la materia orgánica y el impacto de los diferentes tipos de uso de los suelos (Ceretta, 1995).

En los suelos tropicales generalmente ácidos y caracterizados por la mayor presencia de óxidos e hidróxidos de hierro y aluminio, Lobartini & Tan (1988) observaron que el contenido del C alifático en los ácidos húmicos es mayor que el observado por Preston & Schnitzer (1986) en suelos templados, con disminución en el grado de aromaticidad. Esto reveló un camino diferente en el proceso de humificación en las áreas tropicales con la estabilización rápida de los compuestos del carbono debido a su interacción con la fracción mineral.

Sobre las vías de humificación, esto es, de estabilización de los compuestos del C en el suelo, un interesante trabajo de Preston *et al.* (1994) en plantíos recientes de pinos en Canadá, muestra la caída del contenido de la fracción del C ligado a O de la hojarasca hasta los horizontes subsuperficiales minerales, mientras que la fracción del carbono soluble en agua permanece en una profundidad constante. El bajo contenido de materia humificada y la presencia de proporciones elevadas de restos vegetales poco descompuestos, indica que los procesos de humificación en monocultivos pueden estar limitados tanto por la baja fertilidad del suelo como por la inhibición del proceso de descomposición, por la acumulación del C alquílico proveniente de la suberina presente en los tejidos de las hojas.

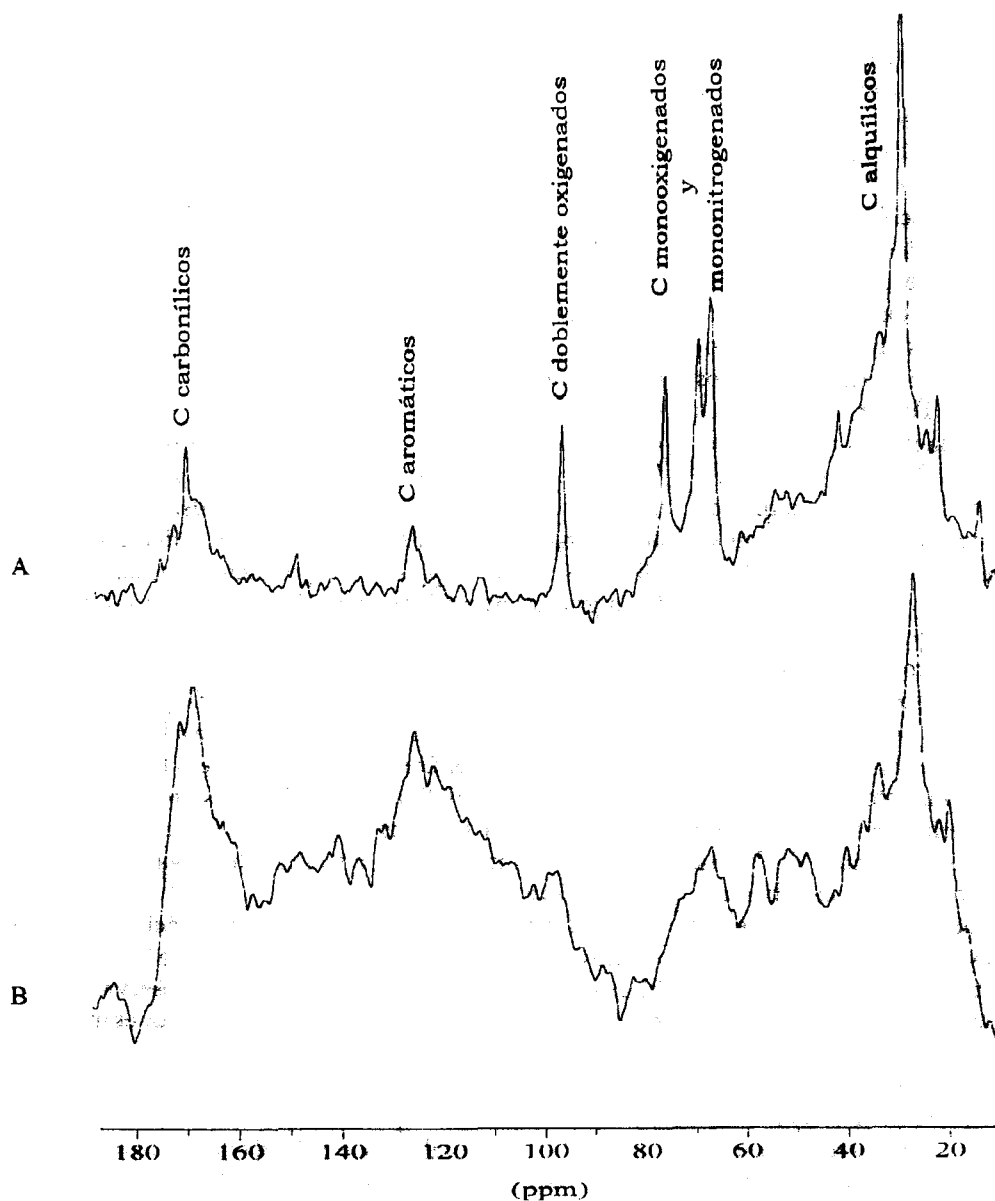


Figura 1. Las principales asignaciones de los picos de absorción se encuentran en la tabla 1.

La evolución de la materia orgánica durante el proceso de descomposición de los restos vegetales y estiércol de animales usados como abonos después de su estabilización, principalmente en la horticultura, ha tenido seguimiento por la técnica de RMN del ^{13}C en trabajos de Inbar *et al.*, (1989). Durante los primeros 60 días de formación de la composta ocurre una rápida transformación del material caracterizada por la disminución del C ligado a carbohidratos y un aumento correspondiente del C alquílico, C aromático y CO_2H . Es posible observar con la técnica de RMN que la rápida trans-

formación de los carbohidratos aparentemente conduce a una acumulación de ligninas modificadas. El aumento de la colecta selectiva de la basura llevada a cabo en las ciudades y la necesidad de descartar este material, ha incentivado la producción de compostas de residuos orgánicos de origen urbano para su uso en áreas agrícolas, principalmente cerca de las grandes ciudades. De la misma forma hay una gran producción de residuos orgánicos por la ampliación del número de instalaciones para el tratamiento de las aguas de desecho urbanas. A pesar de que las tierras de uso agrícola no son la mejor opción de uso para esos residuos (Cameron *et al.*, 1997), vienen siendo utilizados en escala creciente por los horticultores debido a su alto contenido de materia orgánica. El uso de estos residuos orgánicos de origen urbano ha provocado alteraciones en las fracciones estabilizadas de la materia orgánica, la cual presenta un patrón de comportamiento químico diferente al de la materia orgánica encontrada en suelos naturales, sin la intervención de la agricultura (Leinweber *et al.*, 1996). Con el fin de analizar las características de la materia orgánica presente en los residuos urbanos, en la figura 1 se muestran los espectros RMN del ^{13}C de los ácidos húmicos extraídos de una composta de residuo urbano y del lodo oriundo de estaciones de tratamiento de aguas negras producidos en la ciudad del Río de Janeiro. Los ácidos húmicos fueron extraídos con NaOH 0.5 mol/L bajo atmósfera de N_2 , seguido de precipitación en medio ácido (HCl 0.6 M hasta pH 1.0) con centrifugación posterior a 4,500 rpm por 20 minutos, de acuerdo con la recomendación de la International Society of Humic Substances (ISHS). La disolución y preci-

pitación (alternancia de medio alcalino y ácido) fue repetida tres veces, seguida de un tratamiento con solución ácida diluida de ácido fluorhídrico (por diez horas) para la eliminación de impurezas minerales. Después de la purificación, los ácidos húmicos fueron liofilizados. Los espectros en las muestras de ácidos húmicos se obtuvieron a partir de 150 mg de muestra en 1 mL de NaOH 0.5 mol/L (1:1 H₂O : D₂O) en un equipo Bruker con frecuencia de 50.30 MHz para ¹³C, utilizando la técnica de *inverse gated decoupling* para permitir la integración de las regiones de absorción características de los principales agrupamientos funcionales, de acuerdo con lo establecido por Preston y Schnitzer (1986). Ambos espectros fueron obtenidos a temperatura ambiente. Los desplazamientos químicos se refirieron al desplazamiento del tetra metil silano (TMS).

Estos datos permiten indicar un comportamiento diferenciado de las características principales de las tierras donde estos residuos son adicionados. Por ejemplo, Canellas *et al.* (1999) verificaron que la capacidad de adsorción de metales pesados por los ácidos húmicos fue mayor en los ácidos extraídos del lodo de la estación de tratamiento de aguas negras. La energía de adsorción entre los grupos funcionales y los metales pesados también fue mayor en los ácidos húmicos extraídos del lodo, que presentan una cantidad mayor de estructuras más rígidas en las moléculas, *i.e.*, mayor grado de aromaticidad que los ácidos húmicos extraídos de la composta. Entretanto, cuando se compara con los ácidos húmicos extraídos de tierras naturales, se identifica un menor grado de aromaticidad en estos residuos (Canellas *et al.*, 1997) mediante la observación de incremento de áreas en la región de los espectros atribuidos a la absorción de cadenas alifáticas largas y de los carbohidratos (Canellas *et al.*, 1998).

Para el estudio de la dinámica de la materia orgánica en los diferentes ecosistemas, una pregunta permanece a lo largo del tiempo: ¿existe una estructura química definida para los ácidos húmicos? Varias tentativas de respuesta haciendo uso de diversas técnicas (métodos degradativos, métodos de separación de los compuestos, etcétera), han ido apareciendo a lo largo de los años (Schnitzer, 1991). El uso de la RMN junto con otras técnicas espectroscópicas, como la espectroscopía de masas con pirólisis y métodos blandos de ionización, y el avance del modelaje molecular vía computadora, ha permitido el uso de nuevos conceptos y modelos estructurales. Uno de los más recientes es el propuesto por Schulten & Schnitzer (1997).

Se conocen otras aplicaciones de la resonancia nuclear magnética en Ciencias del Suelo (Preston, 1996, 1997). Quizás una de las necesidades más importantes es la de formar grupos multidisciplinarios de investigación con químicos, físicos, agrónomos trabajando en equipo para reformular las estrategias de los estudios que se realizan por separado en

los diversos departamentos de las universidades. Esto permitirá un avance significativo en la comprensión de los ciclos de los compuestos orgánicos en la naturaleza, buscando dar a la agricultura una dirección más equilibrada.

—Nosotros no podemos creer en cosas imposibles—dijo Alice.

—Pues yo digo que usted no tiene aún mucha práctica—dijo la reina— [...] Porque a veces he creído hasta en seis cosas imposibles antes del desayuno.

Lewis Carrol, *Through the looking glass.*

Bibliografía citada

- Bremner, J.M., Some observations on the oxidation of soil organic matter in the presence of alkali, *Journal of Soil Science*, 1: 198-204, 1950.
- Capriel, P., Harter, P., Stephenson, D., Influence of management on the organic matter of a mineral soil, *Soil Science*, 153 (2): 122-128, 1992.
- Cameron, K.C., Di, H.J., McLaren, R.G., Is soil an appropriate dumping ground for our wastes?, *Australian Journal of Soil Science*, 35 (5): 995-1035, 1997.
- Canellas, L.P., Rumjanek, V.M., Santos, G.A., en: Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, 2, São Carlos, 1997. Anais. São Carlos, EMBRAPA-CNPDA, 1997.
- Canellas, L.P., Rumjanek, V.M., Santos, G.A., Moraes, A.A., Revista Brasileira de Ciência do Solo, Viçosa (sometido a la publicación en enero de 1998).
- Canellas, L.P., Santos, G.A., Sobrinho, N.M.B.A., Rumjanek, V.M., Moraes, A.A., Adsorção de Cu²⁺ e Cd²⁺ em ácidos húmicos extraídos de residuos orgânicos de origem urbana, *Ciência Rural*, 29 (1), 1999 (aceptado para publicación).
- Ceretta, C.A., *Fracionamento de N orgânico, substâncias húmicas e caracterização de ácidos húmicos de solo em sistemas de cultura sob plantio direto*, Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 1995. 150 p. (Tese de Doutorado).
- Gil, V.M.S. & Geraldies, C.F.G.C., *Ressonância Magnética nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações*. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 1987, 1012 p.
- Hayes, M.H.B., Swift, R.S., Wardle, R.E., Brown, J.K., Humic materials from a organic soil: A comparasion of extractants and of properties of extracts, *Geoderma*, 13: 231-245, 1975.
- Inbar, Y., Chen, Y., Hadar, Y., Solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance and infrared spectroscopy of composted organic matter, *Soil Science Society American Journal*, 53: 1695-1701, 1989.
- Krosshavn, M., Kögel-knabner, I., Souhthon, T.E., Steinnes, E., The influence of humus fractionation on the chemical composition of soil organic matter studied by solid-state ¹³C NMR, *Journal of Soil Science*, 43: 473-483, 1992.
- Lobartini, J.C. & Tan, K.H., Differences in humic acid characteristics as determined by carbon-13 nuclear magnetic resonance, scanning electron microscopy and infrared analysis., *Soil Science Society American Journal*, 52: 125-130, 1988.
- Preston, C.M., Applications of NMR to soil organic matter analysis: History and prospects, *Soil Science*, 161: 144-166, 1996.
- Preston, C.M., Characterization and transformations of organic matter and humic substances detected by NMR of ¹H, ¹³C, ¹⁵N and ³¹P., en: Encontro Brasileiro sobre Substâncias Húmicas, 2, São Carlos, 1997. Anais. São Carlos, EMBRAPA-CNPDA, 1997, p. 26-31.

Tabla 1. Desplazamientos químicos del ^{13}C de los ácidos húmicos extraídos de la composta de residuos urbanos de la ciudad de Rio de Janeiro, Brasil.

región (ppm)	$\delta^{13}\text{C}^{(1)}$ %	$\delta^{13}\text{C}^{(2)}$ ppm	Posibles atribuciones
0-20	6.3	15.89; 21.0	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_3 \\ \end{array}$ $\text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{R}$
		24.48; 25.51	$\begin{array}{c} \text{R} \\ \\ \text{C}-\text{H} \\ \\ \text{R} \end{array}$
		30.51	$\text{CH}_3-\text{C}=\text{O}$
		35.34; 43.54	CH_2-COOH $\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$
50-70	19.2	51.40	$\begin{array}{c} -\text{C}-\text{COOH} \\ \\ \text{H} \end{array}$
		56.39	$-\text{CH}-\text{NH}_2$ (aminoácido)
		57	$\text{O}-\text{CH}_3$
		63.5	CH_2-OH (alcohol secundario)
		69.74; 72.09; 78.90	$\text{CH}-\text{OH}$
92-140	21.8	99.91	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \text{O} \\ \diagdown \quad / \\ \text{C} \\ / \quad \diagdown \\ \quad \quad \text{O} \end{array}$
		116; 120.5	CH en aromáticos
		130.40	$\text{C}-\text{aril}-\text{C}-\text{CH}(\text{R})_2$
140-160	28.3	1440.3	$\text{aril}-\text{C}-\text{COOH}$
		152; 153.71; 161; 162.8; 164.5	$\text{aril}-\text{C}-\text{OCH}_3$
165-180	8.7	164.5	$\text{aril}-\text{C}-\text{OCH}_3$
		168.5; 170	$\text{aril}-\text{C}-\text{OH}$
		173.8	$\text{CO}-\text{NH}_2$
		174.5	$-\text{COOR}$ (éster)
		175.65	$-\text{COO}$ (ácido)

Preston, C.M., Hempling, R., Schulten, H.R., Schnitzer, M., Trofymow, J.A. & Axelson, D.E., Characterization of organic matter in a forest soil of coastal British Columbia by NMR and pyrolysis-field ionization mass spectrometry, *Plant and Soil*, **158**: 69-82, 1994.

Preston, C.M. & Schnitzer, M., Analysis of humic acids by solution and solid-state carbon-13 nuclear magnetic resonance, *Soil Science Society American Journal*, **50**: 326-331, 1986.

Salas, I.I.R. & Castolo, A.A., Resonancia magnética nuclear de compuestos paramagnéticos, *Educ. Quím.*, **8** (4): 231-240, 1997.

Sanders, J.K.M. & Hunter, B.K., *Modern NMR spectroscopy*, Oxford University Press, London, 1987, 308 p.

Schnitzer, M., Soil organic matter-The next 75 years, *Soil Science*, **151** (1): 41-58, 1991.

Shulten, H.R. & Schnitzer, M., Chemical model structures for soil organic matter and soils, *Soil Science*, **162** (2): 115-130, 1997.

Stevenson, F.J., *Humus chemistry: genesis, composition, reactions*, 2nd edition, John Wiley, New York, 1994, 496 p.

Swift, R.S. & Posner, A.M., Autoxidation of humic acids under alkaline conditions, *Journal of Soil Science*, **23**: 381-393, 1972.

Tan, K.H., Himmelsbach, D.S., Lobartini, J.C., The significance of solid-state ^{13}C NMR spectroscopy of whole soil in the characterization of humic matter, *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, **23** (13 & 134): 1513-1532, 1992.

Wilson, M.A., *NMR techniques and applications in geochemistry and soil chemistry*, Pergamon Press, Oxford, 1987, 353 p.