

PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATÓLICA DEL PERÚ
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA



PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA
DEL PERÚ

**Estudio de la dinámica de la degradación de hojarasca en
bosque tropical amazónico utilizando marcadores químicos de
descomposición**

Tesis para optar por el título de **Licenciada en Química**, que presenta la bachiller:

Brenda Melissa D'Acunha Sandoval

ASESOR: Dr. Eric Cosio

Lima, julio del 2015

RESUMEN

El ciclo de carbono en un bosque tropical se completa por la labor de descomposición que llevan a cabo los organismos detritívoros en el suelo del bosque. Estos actúan sobre el mantillo de hojas, ramas y troncos que se acumulan en el suelo. Dependiendo de la composición del bosque, estas tasas varían, y algunos de los factores determinantes más importantes para ver cuánto demora este proceso son el contenido de fenólicos totales, la proporción de carbono-nitrógeno y los tipos de lignina presentes. Se han realizado numerosos estudios sobre las tasas de desaparición de biomasa y análisis simples de contenidos de distintos indicadores en mantillo pero la dinámica de estos procesos de degradación, así como los principales componentes e intermediarios de la misma, aún están en proceso de caracterización.

Un buen entendimiento del balance de carbono en todo el sistema es crítico para poder determinar su papel en el cambio climático, ya sea como amortiguadora del mismo, o agravando el problema. En particular, para poder realizar esto, es necesario cuantificar los flujos dominantes de salida y entrada de los grandes almacenes de carbono y el control ambiental de estos flujos. Estos esfuerzos en las diferentes determinaciones dependen, principalmente, de modelos predictivos para lo cual, a su vez, se necesitan estimaciones adecuadas de los principales procesos biológicos del ciclo de carbono como son: la absorción de carbono por fotosíntesis, el crecimiento de las plantas y la degradación de las mismas.

Es por ello que este trabajo de investigación tuvo como fin, mediante técnicas analíticas, caracterizar la descomposición de mantillo en bosque evaluando los diferentes marcadores de degradación y ver cómo estos cambian en el tiempo durante el proceso de descomposición.

Es así que se estudió la descomposición de dos especies arbóreas de alta importancia biológica: *Calophyllum brasiliense* Cambess y *Bixa arborea* Huber mediante la técnica de bolsas de descomposición. Estas fueron dejadas en el suelo del bosque de la Reserva Nacional Tambopata y recolectadas en períodos definidos para luego analizar el contenido de fósforo, calcio, polifenoles totales, taninos condensados, celulosa, hemicelulosa, lignina, carbono y nitrógeno y ver la correlación de cada parámetro con la velocidad de degradación del material vegetal.

Se encontraron diferencias significativas en la química de ambas especies, así como en las constantes de descomposición. Se espera que estos resultados puedan ser utilizados en futuras investigaciones y modelos de flujo de carbono en bosques para así tener un mejor entendimiento del balance de carbono y nitrógeno y su papel en el cambio climático.

TEMA DE TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE LICENCIADO EN QUÍMICA

TÍTULO : Estudio de la dinámica de la degradación de hojarasca en bosque tropical amazónico utilizando marcadores químicos de descomposición

ÁREA : Química Bioanalítica

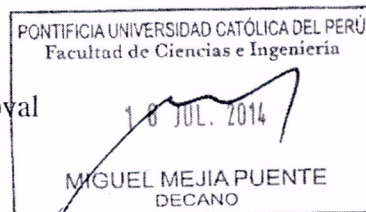
ASESORA : Dr. Eric Cosio

ALUMNO : Brenda Melissa D'Acunha Sandoval

CÓDIGO : 20067205.1

FECHA : 17 de julio del 2014

NUMERO : 2 0 1



DESCRIPCIÓN Y OBJETIVOS:

El ciclo del carbono en bosques tropicales se completa por la labor de descomposición que llevan a cabo los macro y microorganismos detritívoros en el suelo del bosque. Estos actúan sobre el mantillo de hojas, ramas y troncos que se acumulan en el suelo. Dependiendo de la composición de especies arbóreas del bosque, estas tasas varían, y algunos de los factores que más influyen la duración de este proceso, y que por ello determinan la dinámica del ciclo, son el contenido de fenólicos totales en el mantillo, su relación cuantitativa entre carbono y nitrógeno y los tipos y cantidad de lignina presentes. Se han realizado numerosos estudios sobre las tasas de desaparición de biomasa y análisis simples de contenidos de distintos indicadores en mantillo pero la dinámica de estos procesos de degradación, así como los principales componentes e intermediarios de la misma, aún están en proceso de caracterización.

Un buen entendimiento del balance de carbono en todo el sistema es crítico para poder determinar su papel en el cambio climático, ya sea como amortiguadora del mismo, o agravando el problema. En particular, para poder realizar esto, es necesario cuantificar los flujos dominantes de salida y entrada de los grandes almacenes de carbono y el control ambiental de estos flujos. Estos esfuerzos en las diferentes determinaciones dependen, principalmente, de modelos predictivos para lo cual se necesitan estimaciones adecuadas de los principales procesos biológicos del ciclo de carbono como son: la absorción de carbono por fotosíntesis, el crecimiento de las plantas y la degradación de las mismas.

Es por ello que este trabajo de investigación tiene como fin, mediante técnicas analíticas, caracterizar la descomposición de mantillo en bosque evaluando los diferentes marcadores de degradación y ver cómo estos cambian en el tiempo durante el proceso de descomposición.

Máximo: 100 páginas

FIRMA DEL ASESOR:

FIRMA DEL COORDINADOR:

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por todo.

A mis padres, Pili y Jorge, por haberme apoyado, no sólo a lo largo de mi carrera, sino de toda mi vida, y por aguantarme en mis momentos de crisis e impulsarme a seguir adelante.

A Sergio, porque sólo un hermano entiende los momentos de locura de tus padres.

A mi lto, por enseñarme que con constancia y perseverancia se puede llegar lejos.

A mi lta, por su bondad, cariño y paciencia. Por ser la persona más buena y dulce que conocí hasta ahora.

Al Dr. Eric Cosio, por su asesoría a lo largo de todo el tiempo que estuve en el laboratorio. Por su amistad y paciencia.

A la Dra. Norma Salinas, por brindarme las muestras de hojas y por la asesoría invaluable durante todo el proyecto.

A la Dirección de Gestión de la Investigación por el financiamiento recibido.

A Eliana y Fabian, por todo lo que me enseñaron mientras estaba en el laboratorio. Por ser mis amigos y, a veces, cómplices también.

A Anto, Sandra, Mayra y Emiliano, por hacer más felices y divertidos mis días en el laboratorio (aunque a veces demasiado).

ABREVIATURAS

ACN	: acetonitrilo
ADF	: detergente ácido a base de bromuro de cetiltrimetilamonio y ácido sulfúrico
BSTFA	: N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
CE/g dw	: equivalentes de catequina con respecto a gramos de peso seco
DOC	: carbono orgánico disuelto
ESI	: ionización por electrospray
GAE/g dw	: equivalentes de ácido gálico con respecto a gramos de peso seco
GC-MS	: cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC-TOF	: cromatografía de gases acoplada a un detector de tiempo de vuelo
Gt	: gigatoneladas
LC-MS	: cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
M_o	: peso original de la hojarasca
M_t	: peso de la hojarasca luego de un período de tiempo t.
NDF	: detergente neutro
PPC	: complejo polifenol-proteína
RMN	: resonancia magnética nuclear
RT	: tiempo de retención
TOC	: carbono orgánico total
UV	: ultravioleta
UV-Vis	: ultravioleta – visible
XRF	: fluorescencia de rayos X

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	i
TEMA DE TESIS	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
ABREVIATURAS	iv
TABLA DE CONTENIDOS.....	v
INDICE DE FIGURAS.....	viii
INDICE DE TABLAS	x
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Ciclo global del carbono	1
1.2. Los bosques tropicales.....	2
1.3. Ciclo de carbono en los bosques.....	3
1.4. El proceso de descomposición	5
1.5. Factores que afectan la descomposición.....	7
1.5.1. Condiciones ambientales.....	7
1.5.1.1. Temperatura.....	7
1.5.1.2. Humedad.....	8
1.5.2. Compuestos estructurales de las plantas	8
1.5.2.1. Celulosa	8
1.5.2.2. Hemicelulosa	9
1.5.2.3. Lignina.....	10
1.5.3. Metabolitos secundarios de las plantas	13
1.5.3.1. Compuestos fenólicos	13
1.5.3.2. Taninos	14
1.5.4. Macroelementos	15
1.5.4.1. Nitrógeno.....	15
1.5.4.2. Calcio	17
1.5.4.3. Fósforo	18
1.5.5. Organismos descomponedores	18
1.6. Objetivos	20
1.6.1. General	20
1.6.2. Específicos	20

2.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	21
2.1.	Materiales.....	21
2.1.1.	Trabajo de campo.....	21
2.1.2.	Reactivos.....	21
2.1.3.	Instrumentos.....	22
2.1.4.	Programas.....	24
2.2.	Metodología	26
2.2.1.	Recolección y conservación de las muestras	26
2.2.1.1.	Material vegetal	26
2.2.1.2.	Técnica de bolsas de degradación	27
2.2.2.	Análisis elemental de nitrógeno y carbono.....	29
2.2.3.	Determinación de lignina	29
2.2.3.1.	Método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo	30
2.2.3.1.1.	Extracción de lignina para su uso como estándar en el método de floroglucinol HCl y bromuro de acetilo a partir de aserrín.....	31
2.2.3.2.	Método Klason	32
2.2.4.	Contenido de celulosa y hemicelulosa.....	32
2.2.4.1.	Método Updegraff.....	33
2.2.4.2.	Método de Van Soest y Robertson	34
2.2.4.2.1.	Preparación del detergente neutro (NDF)	34
2.2.4.2.2.	Preparación del detergente ácido (ADF).....	34
2.2.4.2.3.	Cuantificación por el método de Van Soest y Robertson	34
2.2.5.	Determinación de compuestos fenólicos totales	35
2.2.5.1.	Determinación del contenido de polifenoles totales	35
2.2.5.2.	Determinación del contenido de taninos condensados	36
2.2.5.3.	Análisis cualitativo de polifenoles	36
2.2.5.3.1.	Extracción de compuestos fenólicos	37
2.2.5.3.2.	Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).....	37
2.2.5.3.2.1.	Reacción de derivatización con BSTFA	37
2.2.5.3.3.	Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC – MS).....	38
2.2.6.	Contenido de fósforo y calcio.....	39
3.	RESULTADOS	40
3.1.	Determinación de la constante de descomposición	40

3.2.	Comparación de los parámetros iniciales	41
3.3.	Cuantificación de carbono y nitrógeno.....	42
3.4.	Cuantificación de lignina.....	44
3.4.1.	Extracción del estándar de lignina a partir de aserrín	44
3.4.2.	Cuantificación de lignina por el método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo	47
3.5.	Cuantificación de lignina por el método de Klason	49
3.6.	Cuantificación de hemicelulosa y celulosa.....	51
3.6.1.	Método de Updegraff	51
3.6.2.	Método de Van Soest y Robertson	52
3.7.	Cuantificación de compuestos fenólicos	54
3.8.	Cuantificación de taninos condensados	56
3.9.	Análisis cualitativo de compuestos fenólicos	59
3.9.1.	Análisis por GC-MS	59
3.9.2.	Análisis por LC-MS	60
3.10.	Cuantificación de calcio y fósforo	62
3.11.	Correlación de los parámetros estudiados.....	66
4.	DISCUSIÓN.....	69
4.1.	Técnica de bolsas de descomposición	70
4.2.	Temperatura y humedad	72
4.3.	Polifenoles totales y taninos condensados	73
4.4.	Lignina	77
4.5.	Celulosa y hemicelulosa.....	79
4.6.	Macroelementos.....	81
4.7.	Dinámica de degradación.....	84
5.	CONCLUSIONES	86
6.	BIBLIOGRAFÍA.....	88

INDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Flujo anual total de carbono a través de los sumideros de carbono más relevantes.
- Figura 2.** Ciclo del carbono en los bosques.
- Figura 3.** Vías generales para la transformación de hojarasca a humus y carbono inorgánico.
- Figura 4.** Estructura de la celulosa.
- Figura 5.** Estructura más común de la hemicelulosa.
- Figura 6.** Monómeros de lignina (monolignoles) y las unidades que forman dentro del polímero de lignina
- Figura 7.** Estructura representativa de un polímero de lignina
- Figura 8.** Estructura de algunos compuestos fenólicos.
- Figura 9.** Estructura de taninos
- Figura 10.** Principales transformaciones del ciclo del nitrógeno.
- Figura 11.** Hojas de *Bixa arborea*
- Figura 12.** Hoja de *Calophyllum brasiliense*
- Figura 13.** Bolsas de nylon colocadas dentro de la parcela para el experimento de descomposición.
- Figura 14.** Parcelas delimitadas para el experimento de bolsas de descomposición.
- Figura 15.** Sensor de temperatura y humedad utilizado en el trabajo de campo.
- Figura 16.** Reacción de formación del complejo que da la coloración azul-verdosa utilizando el método de Updegraff.
- Figura 17.** Determinación de la constante de descomposición para las especies *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense*
- Figura 18.** Contenido de carbono con respecto al tiempo de descomposición del material vegetal.
- Figura 19.** Contenido de nitrógeno con respecto al tiempo de descomposición del material vegetal.
- Figura 20.** Espectro UV-visible obtenido al analizar el estándar extraído de lignina a partir de aserrín.
- Figura 21.** Espectros de absorción reportados por Fukushima (2001) de estándares de lignina extraídos a partir de diferentes maderas.
- Figura 22.** Curva de calibración obtenida del estándar de lignina extraído.

- Figura 23.** Reacción entre la lignina y el floroglucinol en medio ácido para formar el cromóforo con $\lambda_{\text{máx.}} = 550 \text{ nm}$
- Figura 24.** Contenido de lignina Klason en las muestras de hojas de *Calophyllum* y *Bixa* a diferentes tiempos de recolección del material vegetal.
- Figura 25.** Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de celulosa (glucosa) y hemicelulosa (xilosa).
- Figura 26.** Contenido de hemicelulosa para las especies estudiadas.
- Figura 27.** Contenido de celulosa para las especies de *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense*.
- Figura 28.** Reacción de formación del cromóforo a 760 nm para la cuantificación de polifenoles totales.
- Figura 29.** Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la cuantificación de polifenoles totales.
- Figura 30.** Contenido de polifenoles totales para ambas especies.
- Figura 31.** Reacción de formación del cromóforo al reaccionar la vainillina con un tanino condensado.
- Figura 32.** Curva de calibración de catequina utilizada para la cuantificación de taninos condensados.
- Figura 33.** Contenido de taninos condensados para ambas especies.
- Figura 34.** Cromatograma GC-MS obtenido de la muestra de *Calophyllum brasiliense*
- Figura 35.** Cromatograma GC-MS obtenido de la muestra de *Bixa arborea*.
- Figura 36.** Análisis de la muestra de *Calophyllum brasiliense* por LC-MS.
- Figura 37.** Análisis de la muestra de *Bixa arborea* por LC-MS.
- Figura 38.** Curvas de calibración de fósforo (izquierda) y calcio (derecha) para la cuantificación de estos elementos en las especies vegetales.
- Figura 39.** Contenido de calcio para ambas especies.
- Figura 40.** Contenido de fósforo para ambas especies.
- Figura 41.** Diagrama simplificado de un camino de la biosíntesis de polifenoles

INDICE DE TABLAS

- Tabla 1.** Comparación de las constantes de descomposición obtenidas con los valores reportados para las mismas especies por Salinas (2011).
- Tabla 2.** Valores iniciales para los parámetros estudiados para cada una de las especies.
- Tabla 3.** Coeficientes de absortividad molar de estándares de lignina extraídos por el método de dioxano – HCl.
- Tabla 4.** Porcentaje de lignina obtenido para cada una de las especies estudiadas en los diferentes ensayos realizados mediante el método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo.
- Tabla 5.** Valores de lignina obtenidos por el método de Klason para diferentes especies y el error estándar asociado obtenido a partir de tres repeticiones para cada ensayo.
- Tabla 6.** Resultados obtenidos por el método de antrona.
- Tabla 7.** Resultados obtenidos por el método de Van Soest.
- Tabla 8.** Tabla de correlación para *Calophyllum brasiliense*.
- Tabla 9.** Tabla de correlación para *Bixa arborea*.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Ciclo global del carbono

El ciclo de carbono es el ciclo biogeoquímico mediante el cual el carbono es intercambiado por la biósfera, hidrósfera y atmósfera de la tierra. Este ciclo es uno de los más importantes debido a que permite un reciclaje del carbono a través de la biósfera y todos sus componentes (figura 1).

Los organismos intercambian frecuentemente el carbono en forma de CO₂. Por medio de la descomposición o respiración, estos organismos liberan CO₂ a la atmósfera, mientras que por fotosíntesis las plantas y otros productores primarios como algas y fitoplancton pueden captar este gas e incorporarlo a sus sistemas.

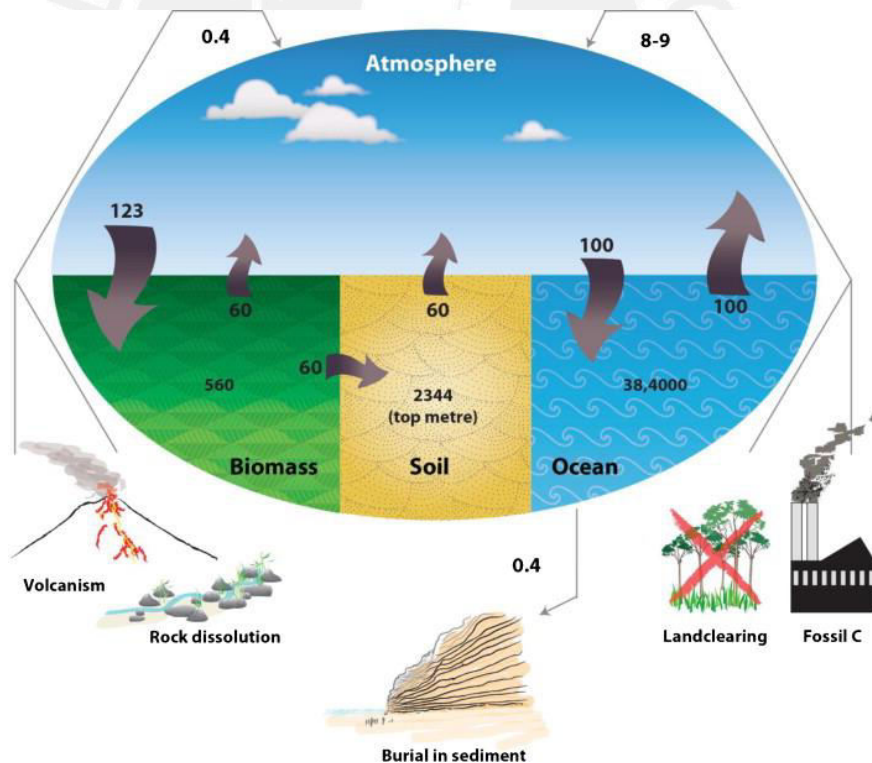


Figura 1. Flujo anual total de carbono en Gt (1 Gt = 1000 millones de toneladas) a través de los sumideros de carbono más relevantes. (Fuente: Stockmann y col., 2013).

Aproximadamente 8,7 Gt de carbono provenientes de fuentes antropogénicas son emitidas a la atmósfera cada año (Lal, 2005). Sin embargo, el aumento de CO₂ atmosférico ha estado en el orden de 3,8 Gt C año⁻¹ (velocidad de incremento en el año 2005 calculada por Denman y col, 2007). Estas estimaciones dejan a la luz la importante capacidad regulatoria de los sumideros o piscinas de carbono en la biósfera. En este contexto, el carbono orgánico del suelo (DOC) tiene el potencial para convertirse en un sumidero “manipulable” para el CO₂ atmosférico.

Como se puede observar en la figura 1, la cantidad de carbono almacenado en el suelo es únicamente superado por el que el océano almacena (38400 Gt). Asimismo, mientras que el C en la biomasa se encuentra alrededor de 560 Gt, el sumidero de DOC, es de más de cuatro veces este número.

La capacidad de almacenar carbono orgánico por parte de los suelos ha sido estimada en diversas investigaciones. Por ejemplo, Guo y Gifford (2002), predijeron que aproximadamente 2344 Gt de carbono se encuentran en los primeros tres metros de profundidad del suelo y, de estos, 1500 Gt se encuentran en el primer metro y 615 Gt en los primeros 20 cm. Esto contrasta con los 9 Gt de “nuevo” carbono liberado por fuentes antropogénicas que ese añade a la atmósfera anualmente por la quema de combustibles fósiles y por degradación del ecosistema. Es así que un cambio de tan sólo 10% en el sumidero de DOC equivale a 30 años de emisiones antropogénicas y podría afectar dramáticamente las concentraciones de CO₂ atmosférico. De manera alternativa, pequeños incrementos en las velocidades de oxidación de C del suelo, como resultado de un incremento en la temperatura, podría resultar en cambios significativos del CO₂ en la atmósfera.

1.2. Los bosques tropicales

Los bosques tropicales ocupan el 7% de la superficie terrestre y el 2% del total del globo. Sin entrar en detalles acerca de los diferentes tipos de bosques tropicales que existen, se puede decir que alrededor de 1000 millones de hectáreas están cubiertas por bosques tropicales y la mitad de esta superficie, aproximadamente, son selvas húmedas concentradas en Latinoamérica, África y el Sudeste asiático, siendo la más

grande la región del Amazonas en Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia, con alrededor de 53 millones de hectáreas (Thomas y Baltzer, 2002).

Los bosques tropicales son también importantes almacenes de carbono. Estos desempeñan un papel central en el ciclo global del carbono pues lo capturan de la atmósfera a medida que crecen y lo almacenan en sus tejidos. Actualmente, los bosques tropicales se encuentran en el centro de atención pues están experimentando un cambio particularmente rápido a causa de la extensa deforestación debido a la tala y quema indiscriminada de los árboles y explotación de los recursos naturales para el uso de las áreas en la agricultura y ganadería, y también por el calentamiento global y efecto invernadero (Achard, 2002; Mayaux, 2005).

Se espera que los continuos cambios globales en el ambiente y sus consecuencias en la diversidad biológica impacten en la estructura y funcionamiento de los ecosistemas y los servicios que estos proveen (IPCC, 2007). Es así que nace la necesidad de realizar diversos estudios para poder buscar opciones para la solución de este problema.

1.3. Ciclo de carbono en los bosques

En los bosques, en especial los tropicales, el balance de carbono es sumamente importante ya que, como se mencionó anteriormente, estos son grandes reservorios o sumideros de carbono (figura 2).

En términos simples, lo que ocurre es que las plantas captan el CO_2 de la atmósfera y lo incorporan a su biomasa mediante el proceso conocido como fotosíntesis. Durante este proceso, las plantas usan la energía solar para combinar CO_2 atmosférico con agua para crear carbohidratos. De esta manera se remueve el CO_2 de la atmósfera y se almacena en la estructura de las plantas. Este carbono puede ser almacenado o secuestrado por períodos relativamente largos dependiendo del tiempo de vida de las plantas (Schlesinger, 2000).

Las plantas también son capaces de liberar carbono a la atmósfera mediante el proceso de respiración celular. Este ocurre cuando, para generar energía, se

consumen los carbohidratos generados durante la fotosíntesis. La respiración de las plantas representa aproximadamente la mitad de CO_2 (60 Pg C/año) en la porción terrestre del ciclo de carbono que es liberado a la atmósfera (Schlesinger, 1991). Otro mecanismo mediante el cual se genera CO_2 se da cuando las plantas mueren, pues sus tejidos (por ejemplo hojas, ramas y troncos) permanecen por largos períodos en los suelos del bosque. Es ahí donde los organismos detritívoros cumplen su función al degradar la materia orgánica y liberar nuevamente el CO_2 a la atmósfera, con lo que se completa el ciclo.

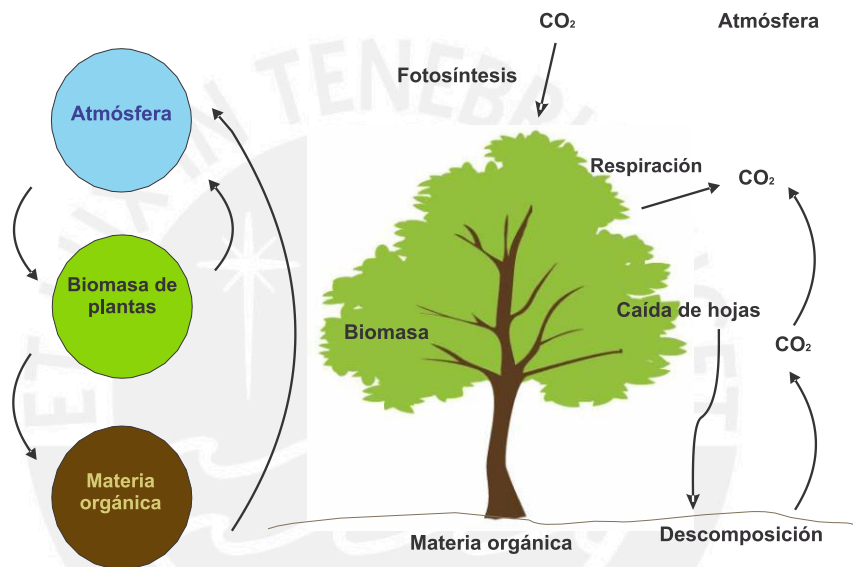


Figura 2. Ciclo del carbono en los bosques. El carbono atmosférico es fijado mediante el proceso de fotosíntesis y liberado mediante la respiración de los árboles y la descomposición microbiana de la materia orgánica presente en los suelos. (Fuente: original).

El ciclo de carbono, entonces, debería estar siempre en un equilibrio dinámico entre la captación y liberación de carbono atmosférico por parte de las plantas y productores primarios. Sin embargo, debido a las distintas actividades humanas que se han llevado a cabo desde hace miles de años, como por ejemplo la extensa deforestación, el uso de combustibles fósiles y la explotación de los recursos naturales, este ciclo se ha visto influenciado de varias maneras. Es así que la liberación de CO_2 tanto por fuentes naturales como antropogénicas supera ampliamente la captación del mismo (Schlesinger, 2000).

Los niveles de CO₂ atmosférico actuales son ahora más altos de lo que han sido durante más de 2 millones de años, aproximándose a los del período del Eoceno, cuando el mundo era esencialmente libre de hielo (Gullison, 2007).

Esta acumulación de CO₂ en la atmósfera de la Tierra ha llevado a diversos problemas ambientales. Uno de los más importantes es el calentamiento global, el cual es un fenómeno que consiste en el aumento de la temperatura media global de la atmósfera y de los océanos. El CO₂, el vapor de agua, el metano y otros gases conocidos como “gases de efecto invernadero” se acumulan en la atmósfera y absorben la radiación solar, de forma que no permiten que esta sea dispersada hacia el espacio y, por el contrario, la reflejan a la Tierra causando un aumento gradual en la temperatura global y alterando los diferentes ciclos biogeoquímicos, el clima, ecosistemas y, en general, toda la Tierra (Gullison, 2007).

1.4. El proceso de descomposición

La descomposición de la hojarasca de plantas involucra un conjunto de procesos complejos que incluyen agentes químicos, físicos y biológicos, que actúan sobre una variedad de sustratos orgánicos que cambian constantemente. En general, en la descomposición, estos sustratos son transformados en compuestos más simples.

Debido a la inmensa diversidad de posibles factores e interacciones, la descomposición en un ambiente natural puede ser descrita únicamente en términos generales. A pesar de esta complejidad, varios procesos importantes están involucrados y se puede tener una idea general de las tendencias.

El volumen de hojarasca de planta consiste en cantidades variables de diversas clases principales de compuestos orgánicos. Las proporciones relativas de estos compuestos varían de acuerdo a la parte de la planta (hojas, tallo, raíces) y también entre especies.

Los compuestos orgánicos en las plantas pueden ser clasificados de acuerdo a su peso molecular, solubilidad y constituyentes primarios. Algunos compuestos, en su mayoría azúcares, fenólicos de bajo peso molecular y algunos nutrientes son

rápidamente degradados o liberados al suelo del bosque debido a la disolución de los mismos en agua y la acción de microorganismos descomponedores. Por otro lado, macromoléculas más grandes, entre las que se encuentran celulosa, hemicelulosas y lignina, son degradadas de manera más lenta. Durante la descomposición, la condensación de los productos de degradación de los compuestos fenólicos y lignina, combinado con la importación de nutrientes, resulta en una acumulación neta de nuevas sustancias formadas. De esta manera, las magnitudes relativas de los principales flujos son diferentes entre tipos de hojarasca y están influenciados por su composición química (Berg y McLaugherty, 2008).

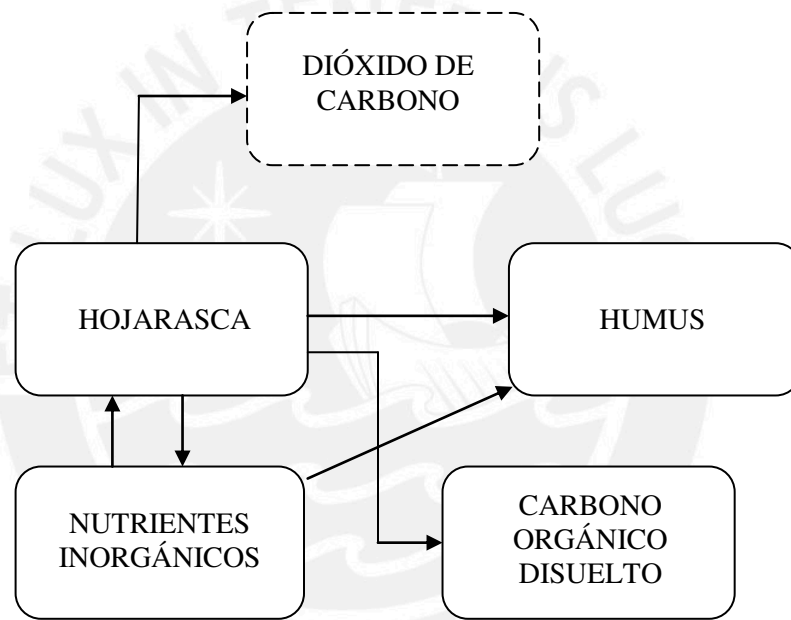


Figura 3. Vías generales para la transformación de hojarasca a humus y carbono inorgánico. Cuando empieza la descomposición de la hojarasca, los microorganismos empiezan a formar CO_2 y los compuestos solubles que están inicialmente presentes son filtrados a los suelos. Lo mismo sucede con los nuevos compuestos formados que son estables, pero que también son solubles en agua (carbono orgánico disuelto, DOC). El humus es formado, finalmente, por los compuestos estables e insolubles en agua. (Imagen modificada de: Berg y McLaugherty, 2008).

1.5. Factores que afectan la descomposición

1.5.1. Condiciones ambientales

Las condiciones ambientales son uno de los principales factores que regulan el proceso de descomposición pues no sólo actúan directamente sobre la hojarasca, sino también sobre los organismos descomponedores, acelerando o disminuyendo su actividad sobre la materia orgánica.

1.5.1.1. Temperatura

La temperatura es una de las condiciones ambientales más importantes que determinan cuán rápidamente son metabolizados los materiales naturales. Un cambio en la temperatura alterará la composición de especies de la flora nativa y al mismo tiempo tiene una influencia directa sobre cada uno de los organismos dentro de la comunidad. El metabolismo microbiano y, por tanto, la mineralización del carbono, son más lentos a temperaturas bajas que a elevadas. Por otro lado, el calentamiento está asociado con liberaciones más grandes de CO₂ (Lal, 2005; Van Meeteren y col., 2007).

Cada especie microbiana y las capacidades bioquímicas de la comunidad como un todo tienen temperaturas óptimas. Es así que se puede definir el coeficiente de temperatura Q₁₀, el cual es una medida de la velocidad del cambio de un sistema químico o biológico como consecuencia de una variación de temperatura de 10 grados. Es decir, mide el efecto de la temperatura en los procesos metabólicos (Xiao, 2000). Así, hay diversos autores que sitúan las tasas máximas de degradación entre 30-40°C. En el rango inferior del óptimo, los incrementos en temperatura aceleran la destrucción del residuo vegetal. Por encima, la rapidez de la descomposición declina excepto en aquellas circunstancias especiales donde la descomposición termófila es activa (Suzuki y col., 2006).

1.5.1.2. Humedad

La humedad, por su parte, también debe ser la adecuada para que la descomposición proceda. El rango óptimo de humedad está entre el 60 y el 80% de la capacidad de retención de agua del suelo. Altos niveles de humedad llevan a una aireación insuficiente (interfieren el movimiento del aire y reducen el suministro de oxígeno necesario para que los descomponedores vivan), que resulta finalmente en una reducción de la actividad de los microorganismos y desacelera la descomposición. Por el contrario, la falta de agua limita el metabolismo microbiano y, así, la velocidad de descomposición también disminuye (Paul, 2001; Ise y Moorcroft, 2006).

1.5.2. Compuestos estructurales de las plantas

Como se ha visto anteriormente, es necesario estudiar los flujos de entrada y de salida de carbono de los almacenes principales, como son los bosques tropicales. Una de las formas de lograr esto es investigando la liberación del carbono captado mediante la descomposición de la hojarasca de bosque. Para esto, es necesario conocer cuáles son los compuestos de las plantas que les brindan mayor resistencia contra los organismos encargados de la descomposición y las condiciones ambientales.

1.5.2.1. Celulosa

La celulosa es el polisacárido más abundante en la naturaleza y el principal constituyente de la pared celular vegetal, proveyéndole rigidez. Este polímero está compuesto por subunidades de D-glucosa unidas por enlaces glicosídicos β -1,4 formando así moléculas de celobiosa. Estas forman cadenas largas (llamadas fibrillas elementales) que están unidas entre sí por medio de puentes de hidrógeno y fuerzas de van der Waals. Las fibrillas elementales forman a su vez a las microfibrillas, que están cubiertas por hemicelulosa y lignina. Las microfibrillas, finalmente, se unen entre sí para constituir la fibra de celulosa (figura 4).

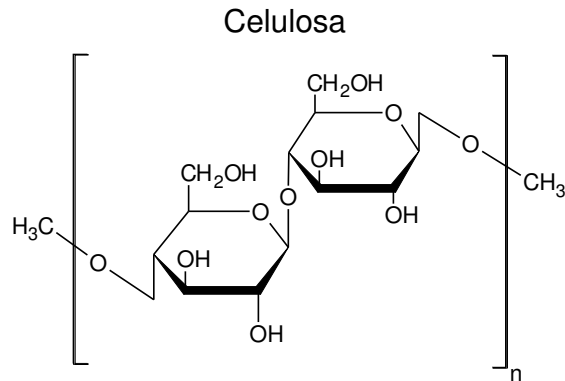


Figura 4. Estructura de la celulosa.

Este polímero puede aparecer en su forma cristalina (llamada celulosa cristalina), pero también, aunque en un pequeño porcentaje, puede estar como cadenas desorganizadas para formar celulosa amorfa. En esta última conformación, la celulosa es más susceptible a la degradación enzimática.

1.5.2.2. Hemicelulosa

La hemicelulosa es el segundo polisacárido más común en la naturaleza, es así que representa alrededor del 20-35% de la biomasa lignocelulósica. Este polímero, a diferencia de la celulosa, tiene un peso molecular menor y es heterogéneo. Consta de unidades de D-xilosa, D-manosa, D-galactosa, D-glucosa, L-arabinosa, ácidos 4-O-metil-glucurónico, D-galacturónico y D-glucurónico que están unidos mediante β -1,4 y ocasionalmente β -1,3 enlaces glicosídicos. Asimismo, la hemicelulosa consiste de cadenas más cortas y ramificadas de 500 – 3000 unidades de azúcar, en comparación con la celulosa que tiene entre 7000 y 15000 y ninguna ramificación (Schadel y col., 2009).

La función principal de las hemicelulosas es su interacción con la celulosa y lignina para proporcionar rigidez a la pared celular. Las cadenas de hemicelulosas se asocian con las microfibrillas de celulosa por puentes de hidrógeno.

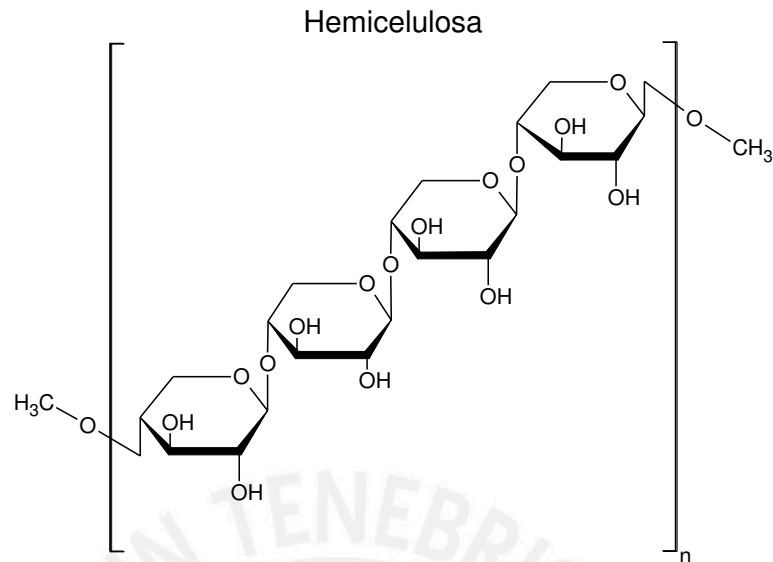


Figura 5. Estructura más común de la hemicelulosa.

1.5.2.3. Lignina

Lignina es el término genérico para un grupo de polímeros aromáticos complejos, de estructura tridimensional y amorfa, que resultan del acoplamiento oxidativo de hidroxifenilpropanoides (como por ejemplo el ácido p-cumárico o el ácido sinápico).

Estos polímeros son depositados predominantemente en las paredes de las células haciéndolas rígidas e impermeables (Vanholme, 2010).

Las unidades más importantes de lignina (monolignoles) son los alcoholes hidroxicinamil, coniferil y sinapil, con menor cantidad de alcoholes p-cumaril. Los monolignoles son sintetizados a partir de fenilalanina según caminos específicos para los fenilpropanoides y monolignoles. Las unidades resultantes de los monolignoles, cuando son incorporadas al polímero de la lignina, se llaman unidades de guaiacil (G), siringil (S) y p-hidroxifenil (H) (figura 6).

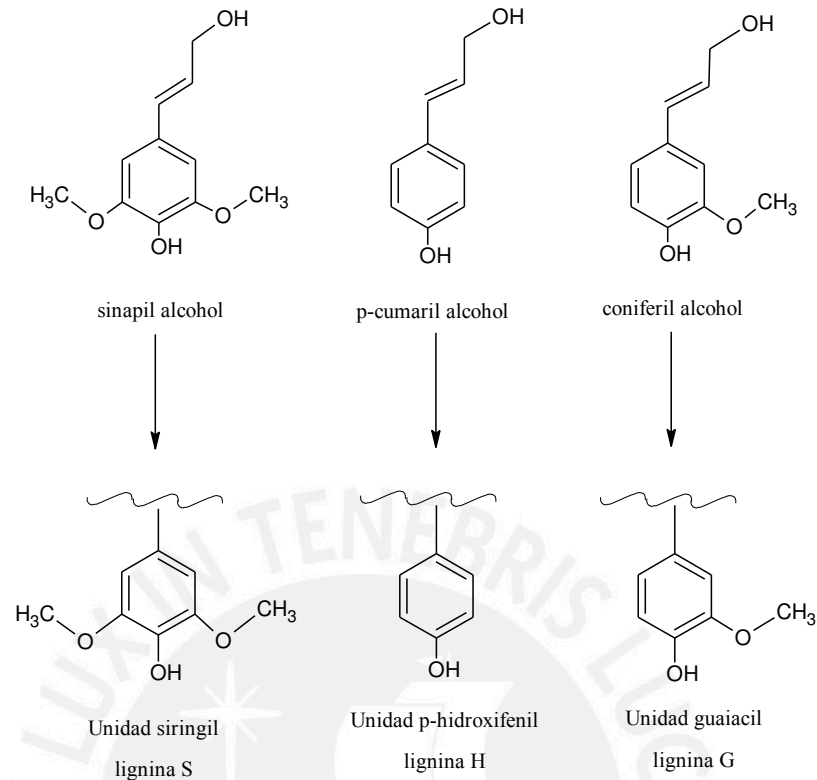


Figura 6. Monómeros de lignina (monolignoles) y las unidades que forman dentro del polímero de lignina.

Dependiendo del tipo de planta que se estudie, el tipo de lignina varía. Por ejemplo, las gimnospermas están compuestas por unidades G en su mayoría (con algunas unidades H), mientras que las angiospermas dicotiledóneas están compuestas por unidades G y S (Vanholme, 2010). En general se distingue entre lignina de gimnosperma o conífera, angiosperma o frondosa y herbáceas. En la figura 7, por ejemplo, se puede observar la estructura de lignina para una angiosperma (*Populus alba*, álamo).

Alrededor del 20% del total del carbono fijado mediante la fotosíntesis en los ecosistemas terrestres es incorporado en lignina, siendo esta el segundo constituyente más importante de la biomasa de las plantas luego de la celulosa (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009). Además de proveer a la planta la rigidez que requiere para crecer en la tierra y tejidos vasculares impermeables para la circulación de la savia, un papel importante de la lignina es proteger al polímero de celulosa de los ataques hidrolíticos

de los patógenos y de organismos saprófitos, que se encargan de degradar la materia orgánica resultante de hojas, ramas y troncos.

La degradación microbiana de lignina por parte de los organismos detritívoros representa un paso clave para completar el ciclo de carbono ya que se remueve la barrera de lignina, la cual es altamente recalcitrante con respecto a la degradación química y biológica, y esto permite a otros microorganismos usar los carbohidratos de la planta y por ende esta se va degradando.

La remoción de lignina también es un aspecto central en la industria del papel, así como también en el uso de la biomasa celulósica, como por ejemplo la producción de bioetanol y la manufactura de reactivos y materiales a base de celulosa (Ruiz-Dueñas y Martínez, 2009).

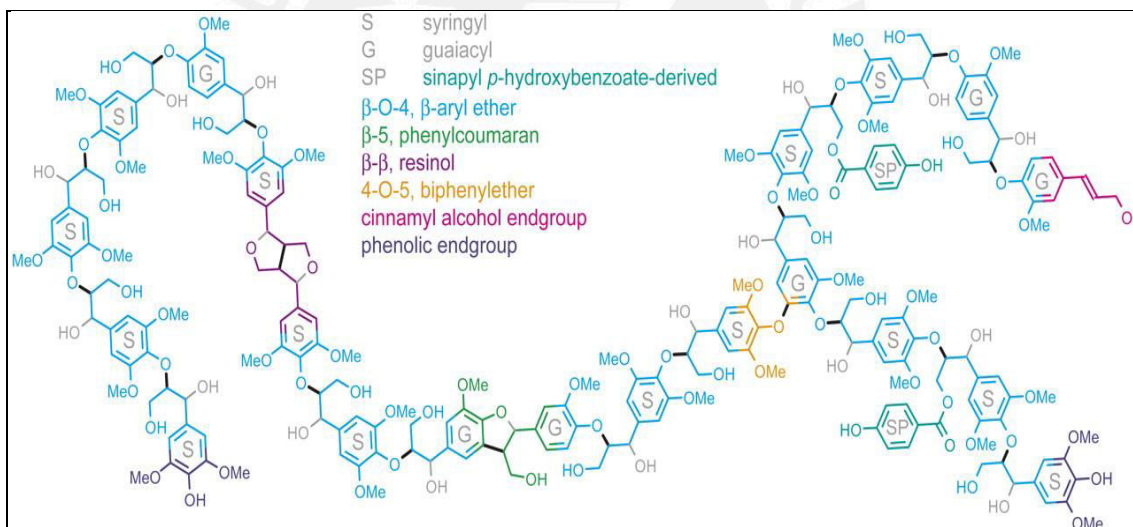


Figura 7. Estructura representativa de un polímero de lignina. Está formado por tres monómeros básicos de sinapil alcohol, coniferil alcohol y *p*-cumaril alcohol. (Fuente: Vanholme y col., 2010).

1.5.3. Metabolitos secundarios de las plantas

1.5.3.1. Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles representan un amplio grupo de moléculas con una variedad de funciones en el crecimiento, desarrollo y defensa de las plantas. (Boerjan, 2003).

Estos compuestos tienen un amplio rango de estructuras químicas, pero todos se caracterizan por tener un anillo aromático con uno o más grupos hidroxilos, junto con otros sustituyentes (figura 8). Por ejemplo, existen desde compuestos fenólicos simples con moléculas compuestas por un solo sustituyente hidroxilo con un anillo bencénico, hasta sustancias poliméricas complejas como son los taninos y ligninas. Algo que cabe resaltar es que la mayoría de compuestos fenólicos no están libres, sino que están presentes como ésteres o glucósidos (Hakkinen, 2000).

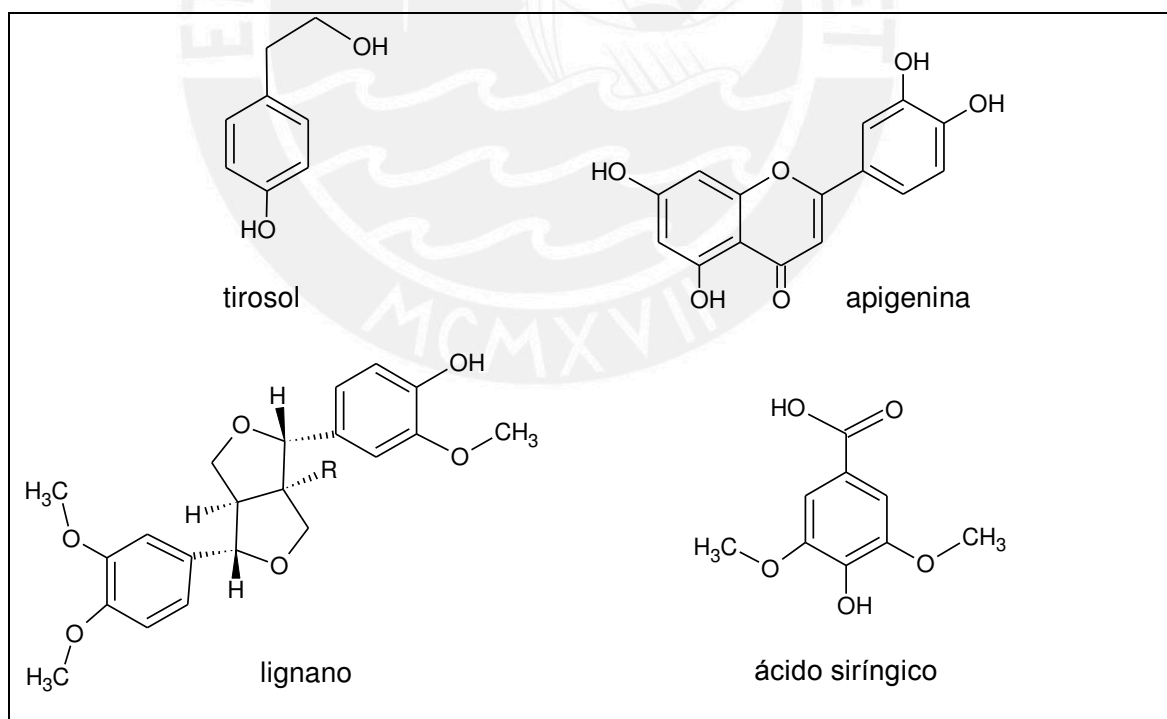


Figura 8. Estructura de algunos compuestos fenólicos.

Existen numerosas formas de clasificar a los compuestos fenólicos debido a su gran diversidad. Según su estructura, se les puede clasificar en ácidos fenólicos, cumarinas y flavonoides. Dentro del grupo de los ácidos fenólicos están los ácidos hidroxibenzoicos (como los ácidos vainillínico, salicílico y gálico) y los ácidos hidroxicinámicos (entre los cuales los cuatro más comúnmente encontrados son los ácidos p-cumárico, cafeico, ferúlico y sinápico). Los flavonoides, por otro lado, ocurren universalmente en todas las plantas superiores y es el más grande y diverso grupo de los compuestos fenólicos. Dentro de este grupo se pueden encontrar compuestos como quercetina y epicatequina (Vermerris y Nicholson, 2008).

Los polifenoles son sintetizados *de novo* por las plantas y son regulados genéticamente, tanto a nivel cualitativo como cuantitativo, aunque a este nivel también existen factores ambientales. Además, actúan como fitoalexinas (las plantas heridas secretan fenoles para defenderse de posibles ataques fúngicos o bacterianos) y contribuyen a la pigmentación de muchas partes de la planta (por ejemplo los antocianos son los responsables de los colores rojo, naranja, azul, púrpura o violeta que encontramos en las pieles de las frutas y hortalizas) (Lattanzio, 2006).

Los compuestos fenólicos totales son considerados como biológicamente activos. Protegen a las plantas tanto del estrés abiótico (como contaminación del aire, iones de metales pesados, radiación UV-B) como del estrés biótico (herbívoros, hongos y bacterias) (Waterman y Mole, 1994), retardando así la descomposición de la materia orgánica.

1.5.3.2. Taninos

Los taninos son un grupo heterogéneo de compuestos fenólicos que son derivados de los flavonoides y del ácido gálico. Se dividen en taninos condensados o proantocianidinas y taninos hidrolizables (figura 9).

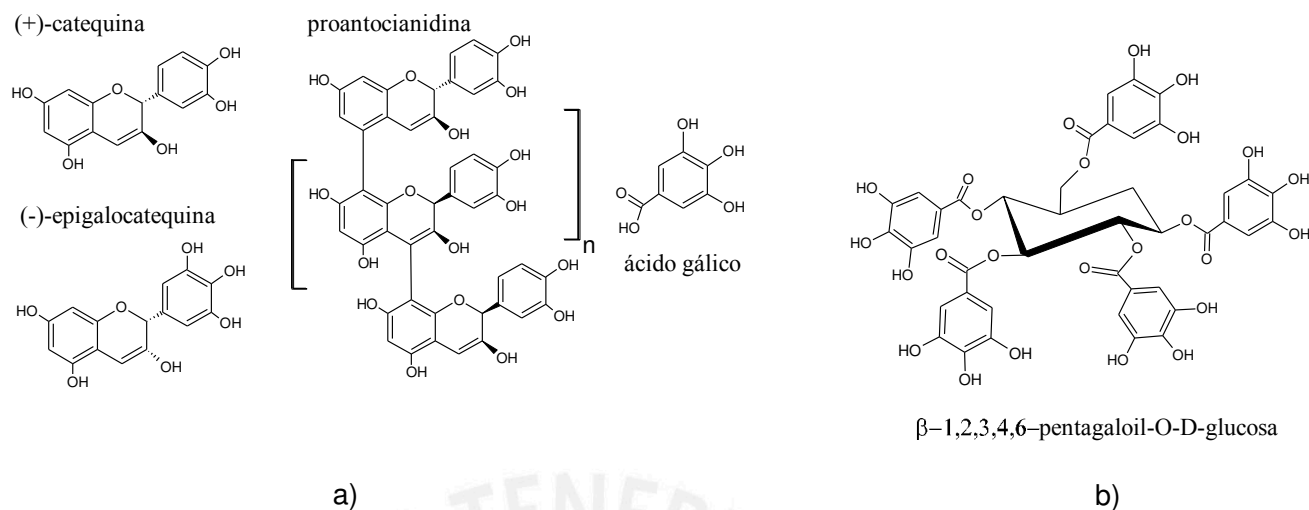


Figura 9. Estructura de taninos. a) (+)-catequina y (-)-epigallocatequina, ejemplos de precursores monoméricos que polimerizan para formar productos macromoleculares como proantocianidinas lineares compuestas de unidades monoméricas de flavanoides y conectadas por enlaces C4-C8. b) Tanino hidrolizable β-1,2,3,4,6- pentagaloi-O-D-glucosa.

Los taninos de hoja juegan un papel importante en la descomposición y el ciclaje de nutrientes en el bosque tropical amazónico. Diversos estudios han mostrado que los taninos están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas contra ataques de bacterias, hongos y herbívoros (Haaze y Wantzen, 2008).

1.5.4. Macroelementos

1.5.4.1. Nitrógeno

El nitrógeno es uno de los elementos críticos para la supervivencia de todos los organismos vivos. Es un componente necesario de muchas biomoléculas, entre las cuales se encuentran proteínas, el ADN y la clorofila.

A pesar de que es un elemento abundante en la atmósfera como N₂, es inaccesible a la mayoría de organismos en esta forma, haciendo del nitrógeno un escaso recurso y

muchas veces limitante de la productividad primaria en los ecosistemas. Sólo cuando el gas nitrógeno es convertido a amoníaco se vuelve disponible a los productores primarios, como son las plantas.

Además de N_2 y NH_3 , el nitrógeno existe en muchas diferentes formas químicas, tanto inorgánicas (amoníaco, nitrato) como orgánicas (aminoácidos y ácidos nucleicos). Por lo tanto, este elemento sufre diversas transformaciones en el ecosistema y cambia de una a otra forma a medida que los organismos lo utilizan.

Las principales transformaciones del nitrógeno son la fijación del nitrógeno, nitrificación, desnitrificación y amonificación, como se puede observar en la figura 10.

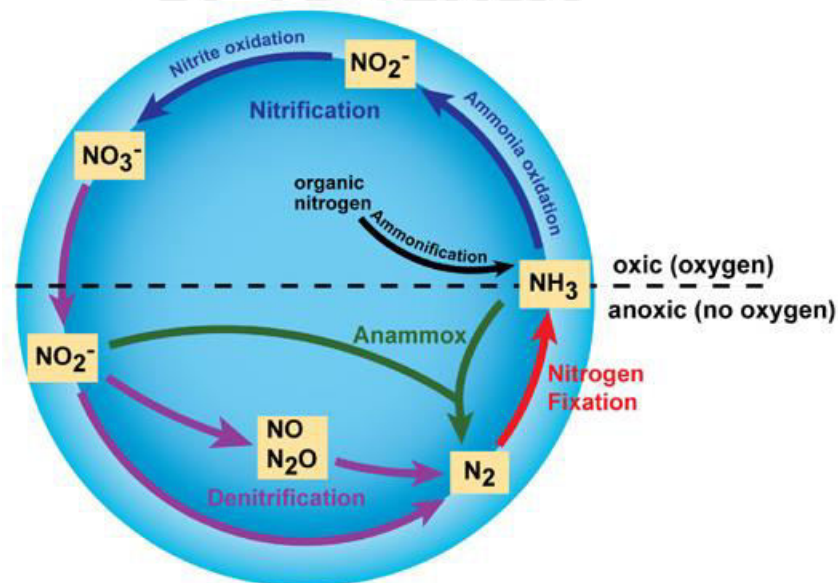


Figura 10. Principales transformaciones del ciclo del nitrógeno. (Fuente: Bernhard, 2010).

El término “fijación de nitrógeno” se refiere a la conversión del nitrógeno atmosférico a una forma que sea disponible para las plantas, como lo es el NH_3 . Este proceso tiene un gran requerimiento energético (16 moléculas de ATP por mol de nitrógeno) pues el N_2 es una molécula muy estable, así que sólo un selecto grupo de procariontas puede realizarlo.

El proceso de nitrificación, por su parte, consiste en la oxidación del amoníaco a nitrito (NO_2^-), seguida de una nueva oxidación del nitrito a nitrato (NO_3^-). La desnitrificación, por otro lado, es el proceso que convierte al nitrato en gas nitrógeno. Retirando el nitrógeno disponible y devolviéndolo a la atmósfera. Del mismo modo, cuando los organismos excretan desechos o mueren, el nitrógeno en sus tejidos está en la forma de nitrógeno orgánico (aminoácidos, ADN). Diversos grupos de microorganismos como hongos y procariotas descomponen este tejido y liberan nitrógeno inorgánico (NH_3) al ecosistema en un proceso llamado amonificación. Así, el amoníaco se vuelve disponible para las plantas y otros organismos del suelo y sigue el mismo ciclo mencionado anteriormente (Bernhard, 2012).

Esta transformación del nitrógeno en sus distintos estados de oxidación es esencial en la productividad en la biósfera y es altamente dependiente de la actividad de diversos microorganismos como bacterias, archea y hongos.

1.5.4.2. Calcio

El calcio es un elemento esencial en el crecimiento y desarrollo de las plantas, así como también en el mantenimiento y modulación de varias funciones celulares.

Este elemento se encuentra normalmente en forma del ion Ca^{2+} como parte de la pared celular de las plantas. Ahí, cumple un papel crítico en determinar la rigidez estructural de la pared celular al unirse de manera estable, pero reversible, con residuos ácidos de pectina (ácido galacturónico) para formar pectato de calcio. Asimismo, el calcio puede proporcionar estabilidad y permeabilidad a la membrana celular al unirse a los grupos fosfato y carboxilo de los fosfolípidos que la conforman.

Adicionalmente a su rol estructural, el calcio juega un papel importante en la regulación de varias funciones celulares, actuando como un mensajero secundario. Este rol como mensajero está involucrado en varios procesos de la planta, desde la toma de nutrientes a cambios en el estado de la célula para ayudar a la planta a reaccionar al impacto del estrés producido por enfermedades y el medio ambiente (Goya y col., 2008).

1.5.4.3. Fósforo

El fósforo es también un elemento importante en las plantas, es parte de compuestos estructurales como son las membranas, y tiene un rol significativo en reacciones bioquímicas como fotosíntesis y señalización celular. En comparación con otros elementos, el contenido de fósforo disponible en el suelo es bastante bajo, de manera que el ciclo de fósforo depende de la actividad microbiana (DeBusk y Reddy, 2005).

El fósforo entra a la planta como el ion orto-fosfato (H_2PO_4^-). Una vez dentro, puede ser almacenado en la raíz o transportado hacia las porciones superiores de la planta. A través de diversas reacciones químicas, es incorporado en los compuestos orgánicos, incluyendo ácidos nucleicos (ADN, ARN), fosfoproteínas, fosfolípidos, azúcares fosfatos, enzimas y compuestos fosfatados ricos en energía, como por ejemplo adenosín trifosfato (ATP). De esta manera, tanto el fósforo orgánico como el inorgánico se mueven a través de la planta, donde están disponibles para reacciones futuras.

Un valor adecuado de fósforo en la planta permite que los procesos mencionados anteriormente operen a velocidades óptimas y que el crecimiento y desarrollo de la planta se dé de manera adecuada. Cuando hay una limitación de este elemento, los efectos más significativos son la reducción de la expansión de la hoja y del área superficial de la misma, así como una disminución en el número de hojas. Asimismo, una cantidad inadecuada de fósforo reduce la velocidad de los procesos de utilización de carbohidratos, mientras que la producción de los mismos a través de la fotosíntesis continúa. Esto produce una acumulación de compuestos orgánicos en la planta y tiene un impacto negativo en el crecimiento, madurez y calidad de la planta (Manzoni y col., 2010).

1.5.5. Organismos descomponedores

La cantidad, tipo y disponibilidad de materia orgánica determinará el tamaño y composición de la comunidad heterotrófica que un suelo contiene. La naturaleza de la flora variará con la composición química de los sustratos añadidos; ciertos grupos microbianos predominarán durante unos días, otros mantendrán altos niveles

poblacionales durante períodos más largos. Cada organismo individual tiene un complejo de enzimas que le permitirá oxidar un determinado grupo de compuestos químicos pero no otros. Si las sustancias adecuadas están presentes en un estado asequible, los microorganismos proliferarán, haciendo que puedan vencer en la competición con otros organismos que tienen potenciales enzimáticos similares.

Los microorganismos estimulados preferencialmente por los componentes de las sustancias orgánicas añadidas forman la flora primaria. Una flora secundaria también se desarrolla, unos creciendo sobre los compuestos producidos por los agentes primarios o creciendo sobre las células muertas o vivas de la flora inicial. Este grupo sucesor de organismos tiene una maquinaria bioquímica distinta de aquella que aparece inicialmente.

La biota incluye una amplia variedad de microorganismos tales como bacterias, hongos, protozoarios, nematodos y virus. En general, las bacterias descomponen los substratos de fácil uso, los compuestos de carbono simple tales como las exudaciones de las raíces y los residuos frescos de las plantas. Los desechos producidos por las bacterias se convierten en materia orgánica. Este desecho es menos descomponible que el material original de plantas y animales, pero puede ser usado por un gran número de organismos. Algunos de estos descomponedores pueden descomponer incluso pesticidas y agentes contaminantes en el suelo. Son especialmente importantes en la inmovilización y retención de nutrientes en sus células y, por lo tanto, previenen la pérdida de nutrientes de la zona de las raíces (Ingham, 2000).

Los hongos descomponen la materia orgánica más resistente, reteniendo en el suelo los nutrientes obtenidos bajo forma de biomasa de hongos y liberación de CO₂. El material menos resistente es descompuesto primero mientras que el material más resistente, como la lignina y las proteínas, es descompuesto en varias etapas. Muchos de los productos de desechos secundarios son ácidos orgánicos; por ello, los hongos ayudan a incrementar la acumulación de materia orgánica rica en ácidos húmicos, resistentes a una degradación posterior (Ingham, 2000).

1.6. Objetivos

1.6.1. General

En el siguiente trabajo se llevó a cabo el estudio de la dinámica de degradación de hojarasca de las especies *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense* en el bosque amazónico peruano por medio del análisis de los principales marcadores químicos de descomposición.

1.6.2. Específicos

- Determinar la constante de descomposición de las especies *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense*.
- Determinar los efectos del contenido de fenólicos y otros metabolitos secundarios característicos de especies arbóreas de bosque amazónico sobre la cinética de degradación.
- Determinar el contenido de lignina, celulosa y hemicelulosa en la hojarasca y estudiar su variación a medida que avanza la descomposición.
- Determinar el contenido de carbono y nitrógeno en la hojarasca.
- Determinar el contenido de fósforo y calcio en la hojarasca.
- Analizar los resultados obtenidos para los distintos parámetros y buscar una correlación entre ellos y la constante de degradación para cada especie.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Materiales

2.1.1. Trabajo de campo

- Bolsas de nylon de 30x30 cm de 1 mm de tamaño de poro

2.1.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado P.A.

Millipore (Massachusetts, EE.UU.)

- Agua purificada tipo II, MilliQ

J.T. Baker (New Jersey, EE.UU.)

- Etanol
- Metanol

Merck (Darmstadt, Alemania)

- Reactivo del fenol según Folin – Ciocalteau
- Bicarbonato de sodio
- Ácido sulfúrico
- Acetona
- Etilenglicol
- Bifosfato de potasio

Sigma – Aldrich (Missouri, EE.UU.)

- Ácido gálico
- Catequina
- Ácido cumárico
- Ácido cafeico
- Ácido ferúlico
- Acido 3,4 - dihidroxibenzoico

- Ácido clorogénico
- Ácido siríngico
- Acido cinámico
- Ácido sinápico
- Vainillina

J.T. Baker (New Jersey, EE.UU.)

- Cloruro de calcio
- Borato de sodio decahidratado
- Celulosa

LECO (Michigan, EE.UU.)

- EDTA

BDH (Poole, Inglaterra)

- Lauril sulfato de sodio

CalBiochem (Darmstadt, Alemania)

- Bromuro de cetiltrimetil amonio

2.1.3. Instrumentos

Perkin-Elmer (Rodgau, Alemania)

- Prensa hidráulica manual 13 mm

Bachofer (Reutligen, Alemania)

- Centrífuga modelo D-7410

Thermo Scientific (California, EE.UU.)

- Centrífuga refrigerada modelo Hereaus Biofuge Stratos

Hettich (Tuttlingen, Alemania)

- Centrífuga modelo EBA 3S

Ika-Works (Carolina del Norte, EE.UU.)

- Vórtex de agitación modelo MS1

Julabo (Seelbach, Alemania)

- Baño termostatzado con agitación

Precision Scientific (Illinois, EE.UU.)

- Autoclave Napco modelo 8000- DSE

Neslab (New Hampshire, EE.UU.)

- Baño refrigerado modelo RTE - 101

Ika-Works (Staufen, Alemania)

- Equipo de agitación modelo KS – 130

ThermoSpectronic (Nueva York, EE.UU.)

- Espectrofotómetro UV-VIS modelo Genesis 6.

LECO (Michigan, EE.UU.)

- Analizador elemental de carbono y nitrógeno CN TruMac Series

Agilent Technologies (California, EE.UU.)

- Cromatógrafo líquido de alta resolución modelo 1200
- Cromatógrafo de gases Hewlett Packard 5890 series II
- Cromatógrafo de gases Agilent 7890B
- Espectrómetro de masas cuadrupolo HP 5972
- Espectrómetro de masas cuadrupolo Agilent 5977B
- Columna de cromatografía de gases HP-5ms ((5%-fenil)-metilpolisiloxano), 30 m de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μ m de espesor de fase estacionaria.

Bruker (Karlsruhe, Alemania)

- Equipo portátil de fluorescencia de rayos X modelo TRACER III-SD
- Espectrómetro de masas con ionización por electrospray modelo Esquire / HCT 6000

Pierce (Illinois, EE.UU.)

- Bloque termostatzado con agitación magnética, Reacti-Therm™, módulo de calentamiento y agitación y unidad de evaporación.

VWR (Pennsylvania, EE.UU.)

- Bloque termostatzado analógico modelo 949311
- Agitador magnético con calentador modelo 625-HPS

Sartorius (Goettingen, Alemania)

- Balanza analítica modelo BP- 210S

Precision Scientific (Illinois, EE.UU.)

- Incubadora modelo 5EG

Haake (Karlsruhe, Alemania)

- Baño termostático modelo 5P

2.1.4. Programas

Análisis químico a las muestras:

- VISIONlite versión 2.1, Thermo Electron Corporation : software para la medición de la absorbancia por espectroscopía UV-Vis
- AMDIS: software para la visualización de los cromatogramas obtenidos por cromatografía de gases.
- NIST 2011: librería para la identificación de los compuestos utilizando los espectros de masas.
- AXS HH programs (S1-pXRF), Bruker: software para la toma de datos por XRF

- Spectra Artax versión 7.4.0.0: software para la cuantificación de los datos obtenidos por XRF
- EsquireControl versión 6.2, Bruker: software para el manejo del LC-MS
- LC/MS ChemStation, Agilent Technologies: software para la visualización de los espectros obtenidos con el LC-MS

Gráficos y arreglos de imágenes:

- ACD / ChemSketch Freeware version 11.0
- Sigmaplot para Windows versión 11.0



2.2. Metodología

2.2.1. Recolección y conservación de las muestras

2.2.1.1. Material vegetal

Se trabajó con hojas frescas de las especies *Calophyllum brasiliense* Cambess y *Bixa arborea* Huber proporcionadas por la Dra. Norma Salinas.

Bixa arborea (figura 11) pertenece a la familia de las Bixaceae. Es originaria de México y del centro y sur de América tropical (Poppendieck, 2001). Se encuentra silvestre también en el bosque tropical amazónico en zonas inundables temporalmente. Crece espontáneamente desde 0 a 300 msnm. Generalmente son árboles de 8 metros, con un tallo recto y cilíndrico y corteza fibrosa con un tinte rojizo (*TROPICOS*, 2015).



Figura 11. Hojas de *Bixa arborea*

El género *Calophyllum*, por otro lado, es miembro de la familia Calophyllaceae, la cual, a su vez, está constituida por 279 especies, todas ellas árboles tropicales. La mayoría se encuentra en la zona Indo- Malasia con extensión hacia las islas Madagascar y Fiji. Se estima que solo ocho especies se distribuyen en el continente americano, desde México hasta las Antillas y Centro América, Venezuela, Colombia, Perú, Bolivia, Brasil y las Guayanas. Este género se encuentra básicamente restringido a selvas húmedas,

en tierras bajas, colinas y a veces en bosques de montaña, aunque algunas especies crecen en hábitats secos (Ibáñez, 2007).



Figura 12. Hoja de *Calophyllum brasiliense*

2.2.1.2. Técnica de bolsas de degradación

Para los fines de esta tesis, la descomposición se realizó utilizando bolsas de degradación. Esta es una técnica ampliamente usada para estudiar la descomposición al nivel de la superficie del suelo (Robertson y Paul, 1999; Salinas y col, 2011). Las hojas frescas son colocadas en bolsas cerradas, depositadas en la superficie del suelo, como se puede observar en la figura 13 y recolectadas en intervalos periódicos de tiempo para medir la masa remanente.



Figura 13. Bolsas de nylon colocadas dentro de la parcela para el experimento de descomposición.

En este experimento se utilizaron bolsas de nylon de 30x30 cm, con 1 mm de tamaño de poro y se colocaron alrededor de 10 g de hojas de la misma especie. Estas fueron dejadas dentro de la hojarasca del bosque en parcelas previamente delimitadas, como se puede observar en la figura 14. Asimismo, se instaló un sensor de temperatura y humedad en un árbol cercano para poder medir estos parámetros (figura 15).

Las bolsas se recogieron en intervalos de tiempo durante un año. Debido a factores externos a este trabajo, no se pudo recolectar muestras hasta los 3 meses de iniciado el ensayo (se recolectó a los 3, 5, 7, 9, 10 y 12 meses). Sin embargo, las muestras correspondientes a los 7 y 14 días de descomposición fueron proporcionadas por la Dra. Norma Salinas.

Al cabo de este tiempo, las muestras se limpiaron cuidadosamente con un pincel para eliminar cualquier tipo de contaminación por causa de la materia orgánica del suelo del bosque, se secaron en un horno a 60°C, se trituraron y después se almacenaron en bolsas herméticas ziplock® hasta el análisis de cada parámetro.



Figura 14. Parcelas delimitadas para el experimento de bolsas de descomposición. (Fotografía: Deustua, 2013)



Figura 15. Sensor de temperatura y humedad utilizado en el trabajo de campo.

2.2.2. Análisis elemental de nitrógeno y carbono

El contenido de nitrógeno y carbono fue medido directamente utilizando un analizador de carbono y nitrógeno LECO TruMac. Para ello, 100 mg de material seco y triturado se pesó directamente en un crisol y fue introducido al analizador. El método utilizado fue proporcionado por LECO para suelo y tejido vegetal (método 203-821-437).

Para la cuantificación se utilizó una curva de calibración con EDTA.

2.2.3. Determinación de lignina

Hasta el momento no hay ningún método absoluto para la determinación de lignina. Tres factores fundamentales contribuyen a este dilema. Primero, el contenido total de lignina en la planta es una colección heterogénea de polímeros que tienen diferentes estructuras y propiedades químicas. Un segundo problema viene del vasto número de compuestos interferentes, entre los que se encuentran compuestos fenólicos producidos por las plantas. Finalmente, cualquier manipulación del material vegetal, desde la trituración hasta la extracción de los compuestos, altera o remueve lignina, y la cantidad que es removida depende de la estructura y composición de la lignina de un tejido en particular (Hatfield y Fukushima, 2005).

Inicialmente se trabajó con el método de floroglucinol-HCl y bromuro de acetilo. Sin embargo, debido a diversos factores que serán explicados en la sección de resultados y discusión, se decidió implementar un nuevo método no colorimétrico, como es el de lignina Klason.

2.2.3.1. Método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo

Se siguió la metodología presentada por Bucholtz y col. (1980) y Garcia y Latgé (1987) con algunas modificaciones. Se pesó directamente 100 mg de material previamente secado y triturado en tubos de plástico de 15 mL y se realizaron tres series de lavados consecutivos. Primero se extrajeron los polifenoles totales que pudieran interferir en la medición de lignina con 5 mL de 70% metanol a 60°C, durante 10 minutos y bajo agitación constante. El material fue centrifugado a 3000 rpm durante 10 minutos y se separó el solvente.

A continuación se lavó el material con 5 mL acetona y se mantuvo la agitación a las mismas condiciones durante 10 minutos. El solvente fue centrifugado y separado.

Finalmente, se lavó con 3 mL hexano bajo agitación durante 5 minutos y se centrifugó y separó el sobrenadante. El residuo sólido que quedó luego de los lavados se secó al vacío hasta estar completamente seco (aproximadamente 30 minutos).

Al material seco se agregó 0,5 mL de 2% floroglucinol en 90% etanol y se dejó incubar durante 5 minutos. Al cabo de este tiempo, se agregó 0,5 mL de HCl 6M y se dejó incubar durante 15 minutos.

Se añadió luego 1,5 mL de una solución de 25% bromuro de acetilo en ácido acético glacial, y luego 1,5 mL más de ácido acético glacial. Se dejó incubar durante 30 minutos, agitando cada 10 minutos y, al cabo de este tiempo, se midió la absorbancia a 554 nm.

Para la cuantificación de la lignina en el material vegetal, se tuvo que preparar una curva de calibración. Ya que la lignina es un polímero heterogéneo y varía de acuerdo al tipo de planta, se decidió extraer un estándar propio a partir de aserrín, pues se presentaba como una matriz parecida a la que se trabajaría (angiosperma).

2.2.3.1.1. Extracción de lignina para su uso como estándar en el método de floroglucinol HCl y bromuro de acetilo a partir de aserrín

El estándar de lignina fue extraído de aserrín, según lo reportado por Fukushima (2001). En una botella de 500 mL se pesó 20 g de aserrín y se extrajo a 60°C con 400 mL dioxano acidificado con HCl (dioxano: HCl 10:1) durante 3 horas, bajo agitación constante y atmósfera de nitrógeno.

Una vez finalizado este tiempo, se dejó enfriar y luego se filtró el sobrenadante utilizando un papel filtro GF/A de 55mm. El filtrado se colocó en un matraz que contenía 30 g de bicarbonato de sodio para neutralizar el pH (aproximadamente 3 horas para llegar a pH 7). Luego se filtró nuevamente bajo las mismas condiciones y se colocó la solución en un balón para rotoevaporar hasta obtener un volumen de entre 10 y 15 mL.

El concentrado resultante fue añadido gota a gota en un vaso con 200 mL de agua destilada y bajo agitación constante hasta observar la formación de un precipitado de color marrón claro que era la lignina. Se centrifugó esta solución a 2000 x g durante 10 minutos para poder separar el sólido y luego se redisolvió en 5 mL de dioxano.

Nuevamente, esta solución se añadió gota a gota en un vaso con 200 mL de éter etílico y bajo agitación constante y se volvió a formar un precipitado. Los lavados con agua y éter se realizaron tres veces cada uno para asegurar la eliminación de todas las impurezas del estándar. Finalmente, el precipitado se colocó en una estufa a 60°C para secarlo completamente y se colocó en un vial.

Para comprobar la pureza del estándar se comparó el espectro ultravioleta obtenido y el coeficiente de absortividad molar con los valores reportados por Fukushima (2004).

2.2.3.2. Método Klason

El método de lignina Klason, a pesar de su antigüedad, constituye un método universal para la cuantificación de lignina. Consiste en determinar la lignina al pesar el residuo que se obtiene después de la hidrólisis de celulosa y otros polisacáridos con ácido sulfúrico. Para esta investigación, se utilizó el método reportado por Hatfield en 1994

Primero se realizó un lavado al material de hojas previamente triturado con 5 mL de 80% etanol a 80°C en intervalos de 15 a 30 minutos, hasta que el sobrenadante quedó incoloro, con el fin de eliminar los compuestos interferentes. Se dejó secar bajo flujo de nitrógeno y luego se pesó 100 mg en tubos de vidrio. A cada tubo se le agregó 3 mL de 72% H₂SO₄ y se dejó incubar en un baño de agua a 30°C durante 1 hora. Al finalizar este tiempo, las muestras se diluyeron hasta llegar a una concentración de ácido de 5% y enseguida se autoclavaron a 120°C durante 1 hora.

Se sacaron las muestras del autoclave y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Luego, se filtró el sobrenadante usando papel filtro GF/A de 2,5 cm previamente pesado. Se secó el papel filtro durante toda la noche en un horno a 90°C y luego se pesó el material.

El residuo sólido que quedó fue la lignina y se pudo determinar su porcentaje con respecto al peso seco inicial.

2.2.4. Contenido de celulosa y hemicelulosa

Para la determinación de celulosa y hemicelulosa se probaron dos métodos. El primero fue el método colorimétrico de antrona propuesto por Uppdegraff (1969) y el otro fue el método gravimétrico de Van Soest y Robertson (1991).

Para la cuantificación de hemicelulosas se realizó una curva de calibración con xilosa y para celulosa se realizó una curva de calibración con glucosa. Así, los resultados se reportaron en miligramos de azúcar con respecto a gramos de peso seco (mg azúcar/g dw).

2.2.4.2. Método de Van Soest y Robertson

Este método se basa en la determinación de celulosa y hemicelulosa al medir la pérdida de peso tras una serie de lavados con detergente neutro, detergente ácido y un lavado final con ácido sulfúrico.

2.2.4.2.1. Preparación del detergente neutro (NDF)

Para la preparación del detergente neutro se mezclaron 1,36 g de borato de sodio decahidratado en una botella con 3,72 g de EDTA y 100 mL de agua milliQ a 50°C y bajo agitación. Luego se añadieron 6 g de lauril sulfato de sodio y 2 mL de etilenglicol. Al mismo tiempo, en otra botella, se disolvió 0,912 g de fosfato de sodio anhidro en 50 mL de agua milliQ a 50°C hasta lograr la disolución completa del sólido. Finalmente, ambas soluciones se mezclaron y se agregaron 50 mL de agua milliQ. El pH de la solución obtenida fue medido con un pH-metro y estuvo entre 6,9 y 7,1.

2.2.4.2.2. Preparación del detergente ácido (ADF)

Se disolvió 4 g del tensoactivo (bromuro de cetiltrimetilamonio) en 200 mL de ácido sulfúrico 2 M bajo agitación constante hasta lograr la completa disolución del sólido. Ambos detergentes se prepararon cada vez que se realizaba la determinación de celulosa y hemicelulosa.

2.2.4.2.3. Cuantificación por el método de Van Soest y Robertson

50 mg del material seco y triturado fue pesado directamente en viales de vidrio de 8 mL, se agregó 5 mL de una solución de NDF y se extrajo por 1 h a 100°C. Al cabo de

este tiempo se separó el sobrenadante, se lavó el residuo tres veces con 5 mL de agua y dos veces con 3 mL de acetona. Finalmente, se secó en un horno a 105°C.

Se pesó el residuo NDF y luego se agregó 5 mL de una solución de detergente ácido. Se siguió el mismo procedimiento que en el caso anterior y se obtuvo el residuo ADF. La diferencia entre los pesos de los residuos NDF y ADF permitió obtener el porcentaje de hemicelulosa.

$$\% \text{Hemicelulosa} = \% \text{NDF} - \% \text{ADF}$$

Luego de la extracción con ADF, se tomó el residuo sólido y se agregó 3 mL de 72% H_2SO_4 . Se extrajo por 3 horas, cambiando el ácido a cada hora. Se lavó el residuo con 3 mL de agua y acetona y se secó en un horno a 100°C.

El contenido de celulosa fue determinado a partir de la diferencia entre el residuo ADF y el ácido sulfúrico.

$$\% \text{Celulosa} = \% \text{ADF} - \% \text{H}_2\text{SO}_4$$

2.2.5. Determinación de compuestos fenólicos totales

2.2.5.1. Determinación del contenido de polifenoles totales

Para la determinación del contenido de compuestos fenólicos totales, se utilizó el método de ensayo colorimétrico con reactivo de Folin-Ciocalteu (Kähkönen, 1999; Kursar y Coley, 2003).

Se pesó directamente en tubos de centrífuga 100 mg de material seco y triturado. Se agregó a cada tubo 5 mL de 70% metanol que se encontraba a 70°C y se agitó durante 10 minutos. Luego de este tiempo, se centrifugó a 2000 x g y se separó el sobrenadante. Al residuo se le agregaron 5 mL más de 70% metanol y se realizó el mismo procedimiento.

Ambos sobrenadantes fueron homogenizados. El residuo sólido fue conservado para el análisis de lignina. Se tomó una alícuota de 100 μL del sobrenadante y se completó el volumen a 200 μL con 70% metanol. Enseguida se agregó 1 mL de reactivo de Folin y

luego 0,8 mL de carbonato de sodio al 7,5%. Finalmente se dejó incubar a 25°C durante 30 minutos y se midió la absorbancia a 765 nm.

La cuantificación de compuestos fenólicos se realizó utilizando una curva de calibración con ácido gálico y se reportaron los resultados como equivalentes de ácido gálico con respecto al peso seco inicial (mg GAE/g dw).

2.2.5.2. Determinación del contenido de taninos condensados

Para la determinación de taninos condensados, se utilizó el ensayo de vainillina (Price, 1978; Sun y Ricardo-da-Silva, 1998).

Se pesó alrededor de 200mg del material en tubos centrífuga y se extrajeron con 10 mL de metanol durante 20 minutos utilizando un equipo agitador. Una vez finalizado el tiempo, se centrifugó a 1500 x g durante 10 minutos y el sobrenadante fue separado.

Se retiró del sobrenadante una alícuota de 0,5 mL y se le añadieron 2,5 mL de una solución 1:1 de 1% vainillina en metanol: 20% ácido sulfúrico en metanol, temperada en un baño de agua a 30°C, agregando 0,5 mL cada vez en intervalos de 1min. Se dejó incubar en un baño de agua a 30°C durante 15 minutos y se midió la absorbancia a 500 nm.

Se utilizó una curva de calibración con catequina para la determinación de taninos condensados. Los valores obtenidos fueron expresados en equivalentes de catequina con respecto al peso seco inicial (mg CE/g dw).

2.2.5.3. Análisis cualitativo de polifenoles

Uno de los problemas de la determinación colorimétrica es que sólo dice cuánto hay, más no qué. Es por eso que se utilizaron las técnicas de GC-MS y LC-MS como indicadores de qué tipo de compuestos están presentes en cada una de las especies y qué implicancias pueden tener en la constante de descomposición. Lamentablemente no se pudo realizar una cuantificación por estos métodos, pues no se tenían los estándares de todos los compuestos presentes.

2.2.5.3.1. Extracción de compuestos fenólicos

Se realizó una hidrólisis básica a 100 mg de material seco y triturado utilizando 5 mL de NaOH 2 M. Se dejó reaccionar bajo agitación constante a 60°C durante 30 minutos y al cabo de este tiempo se neutralizó el pH utilizando HCl 2 M. Se retiró la fase orgánica con acetato de etilo (3 lavados de 10 mL cada uno). Tanto fase orgánica como acuosa se colocaron en balones y se rotoevaporaron a sequedad. Finalmente se redisolvió el sólido obtenido en cada caso en 5 mL de metanol y se guardó hasta el análisis.

2.2.5.3.2. Análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Para analizar las muestras por cromatografía de gases (GC) fue necesario derivatizarlas primero (trimetilsililación). Este procedimiento se realizó con el fin de hacer más volátiles a los polifenoles y así poder analizarlos por la técnica mencionada. El reactivo utilizado para la derivatización fue N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) que es un buen donador de grupos trimetilsilano.

Para evitar la contaminación con agentes plastificadores, en esta parte del trabajo se utilizó únicamente material de vidrio y teflón.

2.2.5.3.2.1. Reacción de derivatización con BSTFA

Se tomaron 40 μ L de la solución obtenida en la sección anterior (2.2.5.2.1) y se colocaron en un vial de 2 mL con inserto de micro volumen. Se evaporó a sequedad con un flujo de nitrógeno y se redisolvió con 5 μ L de piridina. Luego se agregaron 10 μ L de BSTFA y se dejó incubar a 60°C durante 30 minutos en un bloque termostatzado. Al cabo de este tiempo, los compuestos presentes fueron analizados por el siguiente método:

- Columna: HP-DB5
- Temperatura de la interfase GC-MS: 300°C

- Temperatura del horno: 80 °C por 7 min., 80 – 220 °C a 10 °C / min., 220 – 310°C a 20°C/min
- Proporción de Split: Splitless
- Volumen a inyectar: 1 µL.
- Presión de cabeza de columna: 13 psi
- Temperatura de inyección: 280°C
- Voltaje: 70 eV
- Flujo: 0,9 mL / min
- Tiempo total de análisis: 35 min

2.2.5.3.3. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (LC – MS)

Debido a que este método no precisa de una derivatización previa al análisis, se presenta como una buena alternativa para poder analizar qué compuestos están presentes en la mezcla. Para ello, se tomaron 20 µL de la solución obtenida en la sección 2.2.5.3.1 y se inyectaron directamente en el equipo de LC-MS bajo las siguientes condiciones:

Columna	: RP-18 (Lichrospher) de 25 cm de largo y 5 µm de diámetro de partícula.	
Temperatura de columna	: 35 °C	
Volumen de inyección	: 20 µL	
Flujo	: 1 mL / min	
Fase móvil	: ACN y agua acidificada con 0,1% HCOOH	
Gradiente	: 5 a 10% A	5 minutos
	: 10% A	5 minutos
	: 10 a 40% A	15 minutos
	: 40 a 90% A	10 minutos
	: 90 a 5% A	10 minutos
	: 5% A	5 minutos

La detección fue realizada en un espectrómetro de masas Bruker Esquire 6000 con los siguientes parámetros:

- Presión de nebulizador: 50 psi.
- Flujo de N_2 para nebulización: 11 L / min.
- Temperatura de N_2 para nebulización: 365 °C
- Tipo de ionización: electrospray (ESI)
- Modo de ionización: negativa.
- Voltaje de entrada de capilar: 3500 V

2.2.6. Contenido de fósforo y calcio

El análisis de fósforo y calcio se basó en lo reportado por Reidinger (2012). El material limpio, seco y triturado fue prensado y colocado directamente en el instrumento. Para lograr la homogeneidad de las pastillas, se presionó 200 mg de material vegetal triturado durante 60 segundos y a 11 toneladas. Así, se obtuvieron pastillas de 13 mm de diámetro y 2 mm de espesor. Se midió la fluorescencia mediante la técnica de XRF, que se basa en la emisión de rayos X característica de cada elemento.

Las curvas de calibración se realizaron mezclando $CaCl_2$ con celulosa, para la determinación de calcio, y KH_2PO_4 , para la determinación de fósforo.

Las condiciones de análisis fueron:

P-XRF	:	Bruker TRACER III-SD
Fuente de rayos X	:	Objetivo de Rh
Detector	:	Silicio PIN
Voltaje del tubo	:	15kV
Corriente del tubo	:	26 μ A
DetECCIÓN con vacío	:	

3. RESULTADOS

3.1. Determinación de la constante de descomposición

Luego de cada recolección de bolsas, las hojas fueron limpiadas cuidadosamente y secadas en una estufa a 60°C para poder determinar el porcentaje de peso perdido tras la descomposición del material. Para calcular la constante de descomposición, se utilizó un modelo exponencial negativo simple (Olson, 1963), cuya función corresponde a una cinética de primer orden y es: $\ln(M_t / M_0) = -k t$, donde M_0 es el peso original de la hojarasca, M_t es el peso luego de un período de tiempo y t es el tiempo en años. En la figura 17 se puede observar la recta obtenida para cada una de las especies.

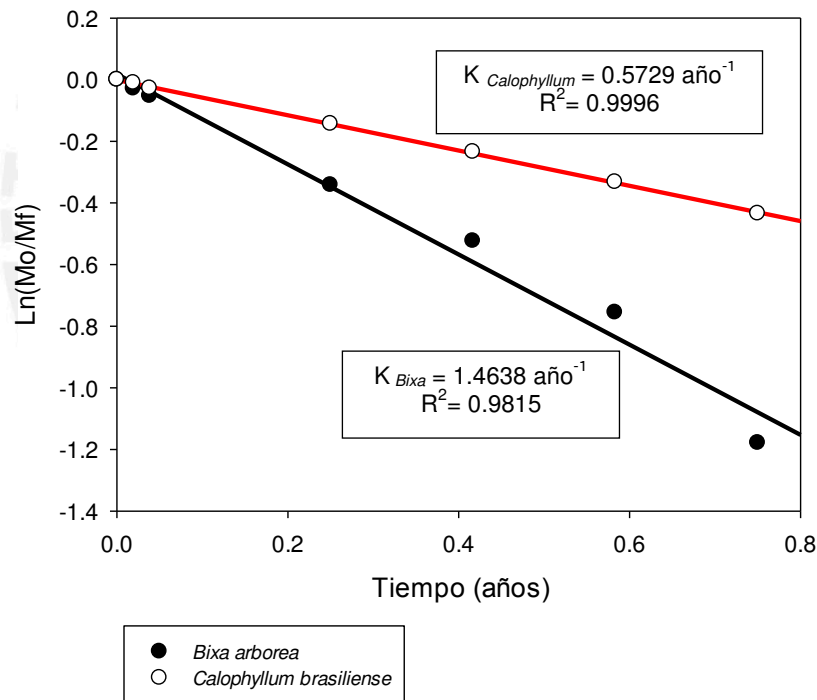


Figura 17. Determinación de la constante de descomposición para las especies *Bixa arborea* ($k=1,46 \text{ año}^{-1}$) y *Calophyllum brasiliense* ($k=0,57 \text{ año}^{-1}$).

Desafortunadamente, debido a factores ajenos al experimento, no se pudieron realizar repeticiones de las recolecciones de un mismo punto, por lo que no se muestra un error asociado. Sin embargo, al observar los resultados obtenidos y compararlos con

reportes previos (Salinas y col., 2011) se pueden observar resultados similares para ambas constantes de degradación, como se muestra en la tabla 1.

En todo caso, con estos valores se puede observar que la especie *Bixa arborea* tiene una constante de descomposición mayor, lo que indica que la degradación del material será más rápida que para el caso de *Calophyllum brasiliense*.

Tabla 1. Comparación de las constantes de descomposición obtenidas con los valores reportados para las mismas especies por Salinas (2011).

Especie	k experimental (año ⁻¹)	k reportada (año ⁻¹)
<i>Bixa arborea</i>	1,46	1,07
<i>Calophyllum brasiliense</i>	0,57	0,59

3.2. Comparación de los parámetros iniciales

La calidad de la hojarasca ha sido considerada como el principal atributo de predicción de la descomposición (Aerts, 1997), puesto que se ha encontrado una fuerte relación entre la pérdida de peso y algunos indicadores de calidad, por ejemplo el contenido de lignina, fenoles, N, P, C/N, entre otros (Castellanos y León, 2011).

En la tabla 2 podemos observar los valores encontrados para cada una de las especies. *Calophyllum brasiliense* tiene un menor contenido de hemicelulosa y macroelementos (nitrógeno, fósforo y calcio), pero supera a *Bixa arborea* en el contenido de lignina, compuestos fenólicos y taninos condensados. Asimismo, las proporciones C/N, C/P y lignina/N son mayores para *Calophyllum*. Por otro lado, el contenido de celulosa y carbono es similar para ambas especies.

Tabla 2. Valores iniciales de los parámetros estudiados para cada una de las especies.

Parámetro	<i>Bixa arborea</i>	<i>Calophyllum brasiliense</i>
%N	2,29 ± 0,05	1,42 ± 0,01
%C	48,88 ± 0,41	52,41 ± 0,01
%Lignina	39,84 ± 2,02	45,01 ± 2,17
%Celulosa	13,46 ± 1,15	15,22 ± 2,33
%Hemicelulosa	21,52 ± 1,27	9,62 ± 0,39
%P	0,12 ± 0,02	0,05 ± 0,01
%Ca	1,74 ± 0,08	0,45 ± 0,04
%Polifenoles	2,83 ± 0,37	6,71 ± 0,59
%Taninos	0,26 ± 0,01	4,18 ± 0,18
C/N	23,28 ± 0,59	36,91 ± 0,17
C/P	402,86 ± 1,46	1079,02 ± 2,54
Lignina/N	17,40 ± 3,35	31,70 ± 2,89

3.3. Cuantificación de carbono y nitrógeno

A medida que el tiempo aumenta, es posible ver una disminución tanto del contenido de carbono como de nitrógeno (figuras 18 y 19). Esto se debe a que, por la degradación, distintos compuestos carbonados y nitrogenados se convierten a CO₂ y NH₄⁺ respectivamente, y son liberados al ambiente. Asimismo, se puede observar que hay leves incrementos en las concentraciones de nitrógeno; esto ocurre por acción de los organismos descomponedores, quienes pueden transferir nutrientes a la planta e inmovilizarlos, de manera que la estequiometría de estos elementos sea propicia para su desarrollo.

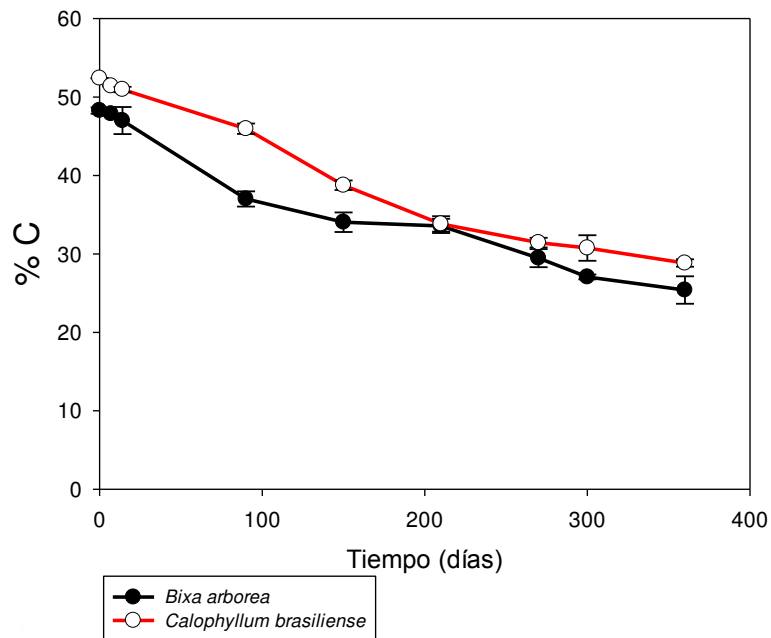


Figura 18. Contenido de carbono con respecto al tiempo de descomposición del material vegetal.

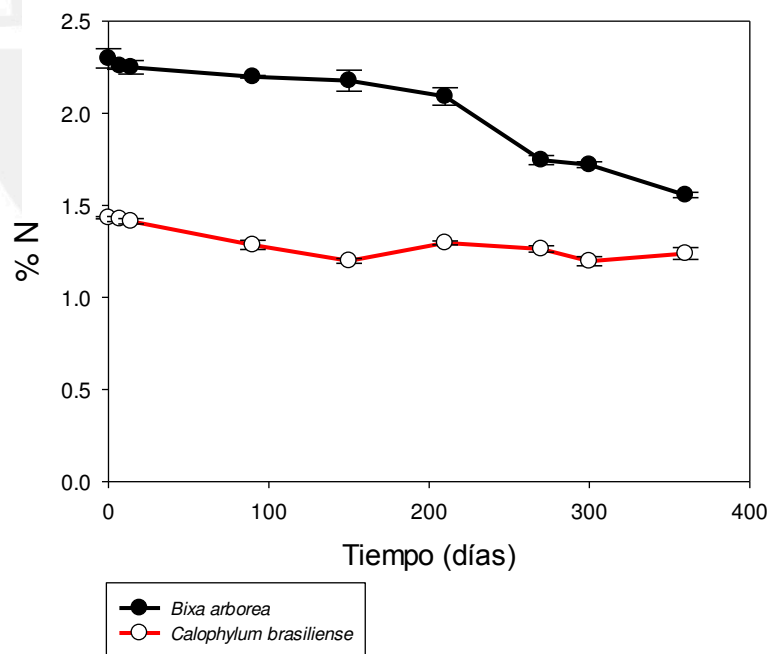


Figura 19. Contenido de nitrógeno con respecto al tiempo de descomposición del material vegetal.

3.4. Cuantificación de lignina

La lignina es uno de los componentes más recalcitrantes de las plantas. Es así que muchos autores reportan que es uno de los determinantes del tiempo de descomposición. Debido a que es un polímero complejo, su análisis es bastante complicado. Es así que existen varios métodos para determinar lignina, aunque no necesariamente son comparables entre sí pues extraen diferentes tipos de lignina presentes en las plantas.

Para este análisis, se probaron dos métodos, uno colorimétrico (floroglucinol y bromuro de acetilo) y otro gravimétrico (Klason) pues son los más reportados en la literatura. A continuación se reportan los resultados obtenidos para cada uno.

3.4.1. Extracción del estándar de lignina a partir de aserrín

Se siguió el procedimiento detallado en la sección 2.2.3.1.1 para la extracción del estándar de lignina. Debido a que este compuesto es un polímero heterogéneo, no hay, hasta el momento, una forma de determinar su composición exacta. Por ello, para poder analizar si la lignina obtenida iba a servir como estándar, se comparó con los valores reportados por Fukushima y col. (2001) y (2004), quienes extrajeron lignina a partir de diferentes maderas para ser usada como estándar en el método de bromuro de acetilo.

Primero se realizó un barrido en todo el espectro UV-Vis del estándar obtenido. Como se muestra en la figura 20, presenta picos de absorbancia máxima a 250 y 277 nm.

Estos valores concuerdan con lo observado por Fukushima (figura 21) para diferentes maderas, con picos de absorbancia máxima a 250 y 280 nm.

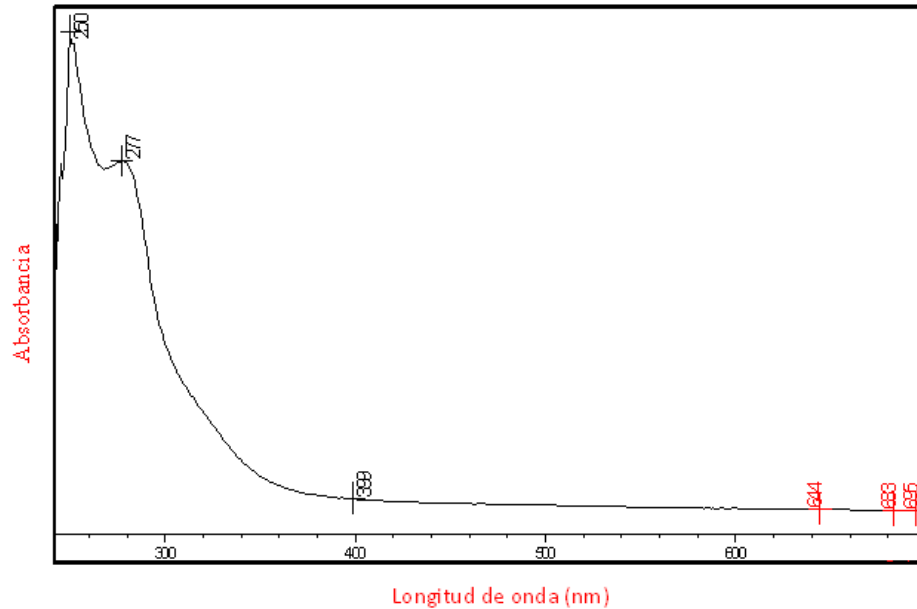


Figura 20. Espectro UV-visible obtenido al analizar el estándar extraído de lignina a partir de aserrín. Se pueden observar los máximos de absorción a 250 y 277 nm.

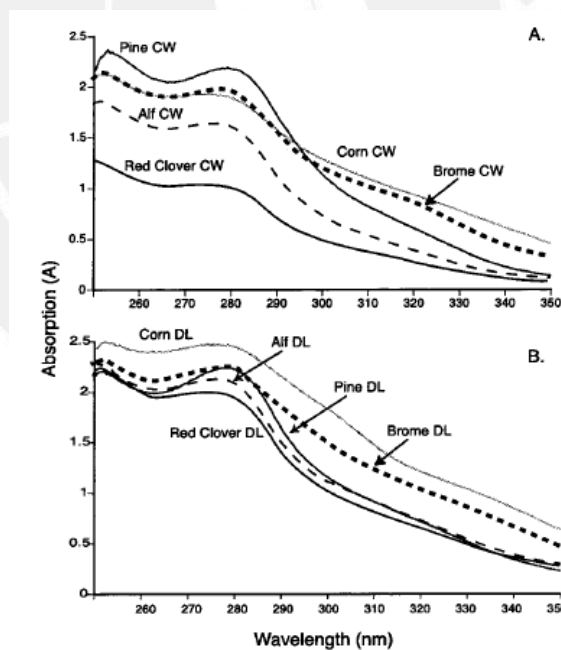


Figura 21. Espectros de absorción reportados por Fukushima (2001) de estándares de lignina extraídos a partir de diferentes maderas. (A) lignina extraída a partir de la pared celular. (B) Espectro obtenido a partir de lignina extraída con dioxano.

Al comprobar que se obtuvo un estándar que era comparable con el teórico, se realizó una curva de calibración para comparar el coeficiente de absortividad molar con los reportados por Fukushima (2004).

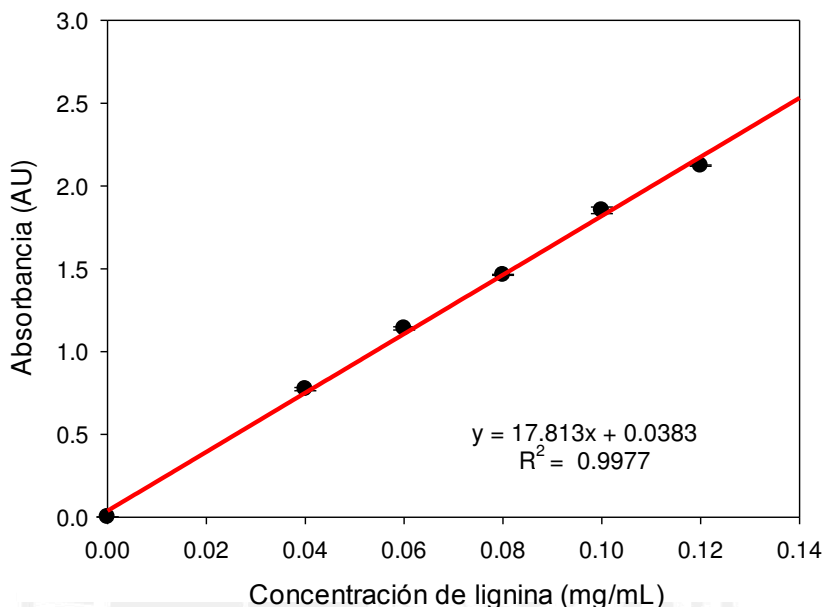


Figura 22. Curva de calibración obtenida del estándar de lignina extraído. Se incluye el factor de r^2 y la ecuación de la recta obtenida. Cada punto de la curva es un promedio de los resultados con su respectivo error estándar ($n = 3$).

De la curva de calibración, se obtuvo un coeficiente de absortividad molar de $a = 17,813$ L/g-cm. Este se comparó con los valores obtenidos por Fukushima y que se muestran en la tabla 3. Como se puede observar, el valor obtenido es bastante cercano a la media de las diferentes especies de madera con las que se trabajó. Es así, que se pudo concluir que la lignina obtenida por este método podía ser usada como estándar para las determinaciones.

Tabla 3. Coeficientes de absortividad molar de estándares de lignina extraídos por el método de Dioxano – HCl. Fukushima (2004). Los datos son las medias de seis observaciones. Y, joven; M, madura (1-3 se refiere a tres etapas diferentes de madurez); W, salvaje; PA, antesis pasada; FB, floración completa; PSD, después del desarrollo de la semilla.

Fuente de lignina	a (L/g-cm)
Paja de avena (hoja)	20,097
Paja de trigo (hoja)	19,808
Setaria M3, W	18,955
Paja de avena (tallo)	18,910
Madera de álamo	17,898
Tallo de maíz PA	17,747
Paja de trigo (stem)	17,542
Alfalfa FB, mayor a 30	15,988
Alfalfa Y	15,693
Alfalfa PSD	15,297
Trébol rojo FB	14,478
Alfalfa, menor a 30	14,232
Madera de Pino	13,785
Media	17,084

3.4.2. Cuantificación de lignina por el método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo

El método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo se basa en la reacción de los grupos terminales de coniferaldehído de la lignina con el floroglucinol para dar un complejo rojo-violeta con un máximo de absorción a 550 nm, como se puede observar en la siguiente figura.

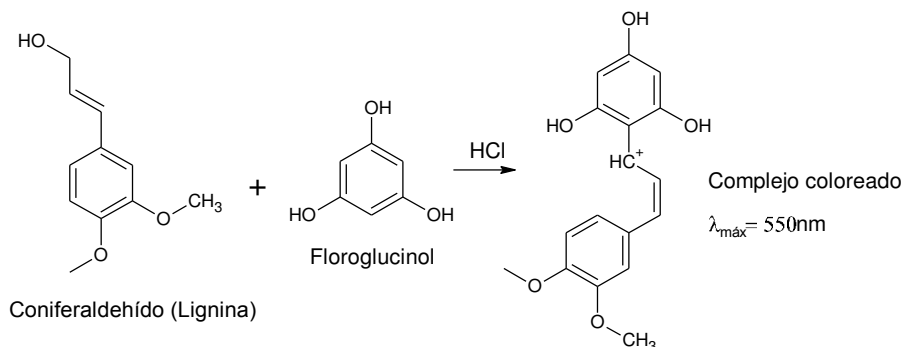


Figura 23. Reacción entre la lignina y el floroglucinol en medio ácido para formar el cromóforo con $\lambda_{\text{máx.}} = 550\text{ nm}$.

Se realizaron diferentes ensayos utilizando este método para poder comprobar su repetitividad. Sin embargo, se pudo observar que en cada ensayo se obtenía un valor diferente de lignina a pesar de trabajar con las mismas condiciones. Incluso se trabajó con otras especies de árboles (*Mabea nítida*, *Symphonia globulifera* y *Rinorea guatemalensis*), tanto en hojas frescas como en descomposición, para ver si esta tendencia se mantenía, y se llegó a la misma conclusión. Esto se puede observar en la tabla que se muestra a continuación.

Tabla 4. Porcentaje de lignina obtenido para cada una de las especies mediante el método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo. F, hojas frescas; L, hojas en descomposición; N.D, no determinado.

Especie	Ensayo 1 (%Lignina)	Ensayo 2 (%Lignina)	Ensayo 3 (%Lignina)
<i>Mabea nitida</i> F	41,44 ± 1,27	22,03 ± 1,73	67,10 ± 15,44
<i>Mabea nitida</i> L	4,53 ± 0,84	26,68 ± 2,16	7,41 ± 11,31
<i>Symphonia globulifera</i> F	46,12 ± 3,21	32,60 ± 1,73	74,66 ± 1,73
<i>Symphonia globulifera</i> L	20,30 ± 1,41	42,03 ± 2,68	32,92 ± 2,68
<i>Calophyllum brasiliense</i> F	32,51 ± 0,56	19,56 ± 2,65	52,66 ± 3,44
<i>Calophyllum brasiliense</i> L	2,86 ± 0,22	28,56 ± 0,99	8,67 ± 6,97
<i>Bixa arborea</i> F	34,56 ± 4,11	19,42 ± 5,48	55,97 ± 5,88
<i>Bixa arborea</i> L	7,46 ± 1,67	12,05 ± 2,36	20,43 ± 8,81
<i>Rinorea guatemalensis</i> F	62,37 ± 3,12	38,90 ± 2,08	N.D
<i>Rinorea guatemalensis</i> L	35,39 ± 5,11	21,82 ± 13,04	N.D

Al ver la amplia variación en los resultados se realizó una búsqueda en la literatura y se encontró que los principales problemas del método se deben a posibles interferencias de compuestos que pueden reaccionar con floroglucinol, como los polifenoles y las proteínas.

Asimismo, el complejo formado no es muy estable y la absorbancia puede cambiar rápidamente en el tiempo. Otro problema que se pudo observar es que no todo el material quedaba disuelto en el bromuro de acetilo y pequeñas partículas quedaban suspendidas en la solución. Al trasvasar a una celda para medir la absorbancia, estas partículas afectaban la trayectoria de la luz y modificaban los valores obtenidos.

3.5. Cuantificación de lignina por el método de Klason

Para este método también se realizaron dos ensayos a diferentes tiempos para poder observar la repetitividad y varianza. En la tabla 4 se muestran los resultados obtenidos para las mismas especies que en el ensayo de floroglucinol:

Tabla 5. Valores de lignina obtenidos por el método de Klason para diferentes especies y el error estándar asociado obtenido a partir de 3 repeticiones para cada ensayo. F, hojas frescas; L, hojas en descomposición

Especie	Ensayo 1 (% Lignina \pm error)	Ensayo 2 (% Lignina \pm error)
<i>Mabea nitida</i> F	25,35 \pm 0,91	26,30 \pm 0,52
<i>Mabea nitida</i> L	31,09 \pm 0,62	31,95 \pm 0,73
<i>Symphonia globulifera</i> F	25,29 \pm 0,89	27,31 \pm 0,17
<i>Symphonia globulifera</i> L	29,94 \pm 1,19	30,63 \pm 0,31
<i>Calophyllum brasiliense</i> F	37,22 \pm 0,61	38,79 \pm 1,15
<i>Calophyllum brasiliense</i> L	40,91 \pm 0,79	43,69 \pm 0,82
<i>Bixa arborea</i> F	31,40 \pm 1,12	36,29 \pm 0,83
<i>Bixa arborea</i> L	23,84 \pm 1,08	25,78 \pm 0,85
<i>Rinorea guatemalensis</i> F	15,85 \pm 0,07	16,21 \pm 1,22
<i>Rinorea guatemalensis</i> L	18,17 \pm 0,83	16,67 \pm 0,31

A diferencia del método anterior, la lignina Klason sólo presentaba variaciones estadísticamente insignificantes, tanto en las repeticiones de un mismo ensayo, como en ensayos a diferentes tiempos. Es por eso que se decidió trabajar con este método para todas las muestras obtenidas de las bolsas de descomposición de las especies de *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense*.

En la figura 24 se pueden observar las curvas obtenidas para ambas especies que muestran la variación del contenido de lignina a lo largo del tiempo de descomposición.

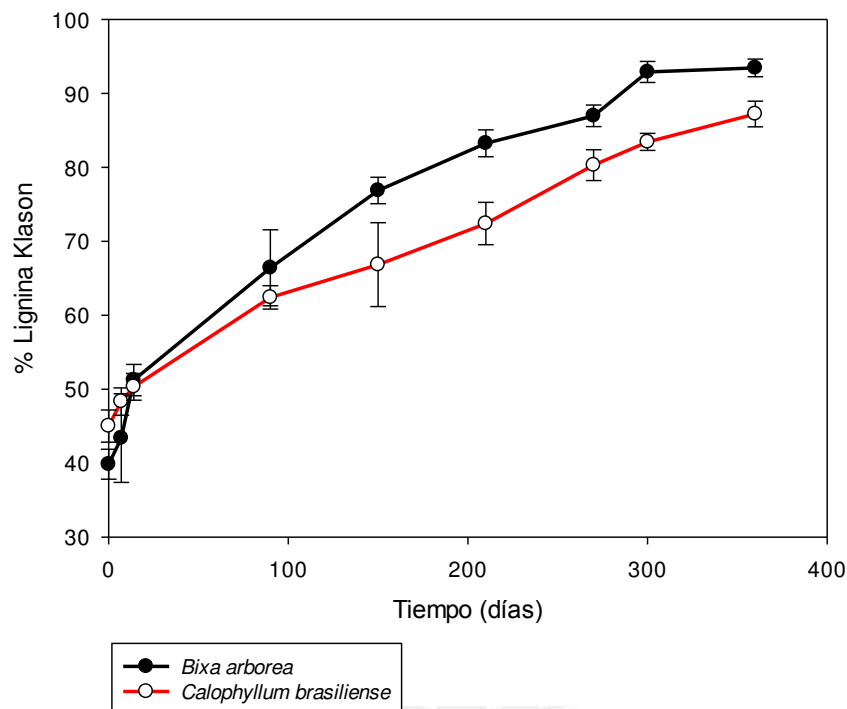


Figura 24. Contenido de lignina Klason en las muestras de hojas de *Calophyllum* y *Bixa* a diferentes tiempos de recolección del material vegetal. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Como se puede observar, el contenido de lignina inicial en *Calophyllum brasiliense* es mayor al de *Bixa arborea* (51,21% y 39,84% respectivamente). Estos valores tienen una relación directa con la constante de descomposición, como se ha descrito anteriormente en diversas publicaciones (Berg y McClaugherty, 2008; Rahman y col., 2013) y confirma la hipótesis de que a mayor contenido de lignina el material será de

descomposición más lenta. Las hojas lignificadas son rígidas en estructura, y altamente resistentes al decaimiento.

Asimismo, los valores van aumentando con respecto al tiempo pues otros componentes van desapareciendo, lo que origina que la concentración de lignina aumente en la muestra tomada y por tanto, el valor sea superior.

3.6. Cuantificación de hemicelulosa y celulosa

3.6.1. Método de Updegraff

Para poder medir celulosa y hemicelulosa, primero se tuvieron que realizar las curvas de calibración de glucosa (para el análisis de celulosa y hemicelulosa) y xilosa (para la determinación de hemicelulosa). Ambas curvas se muestran a continuación.

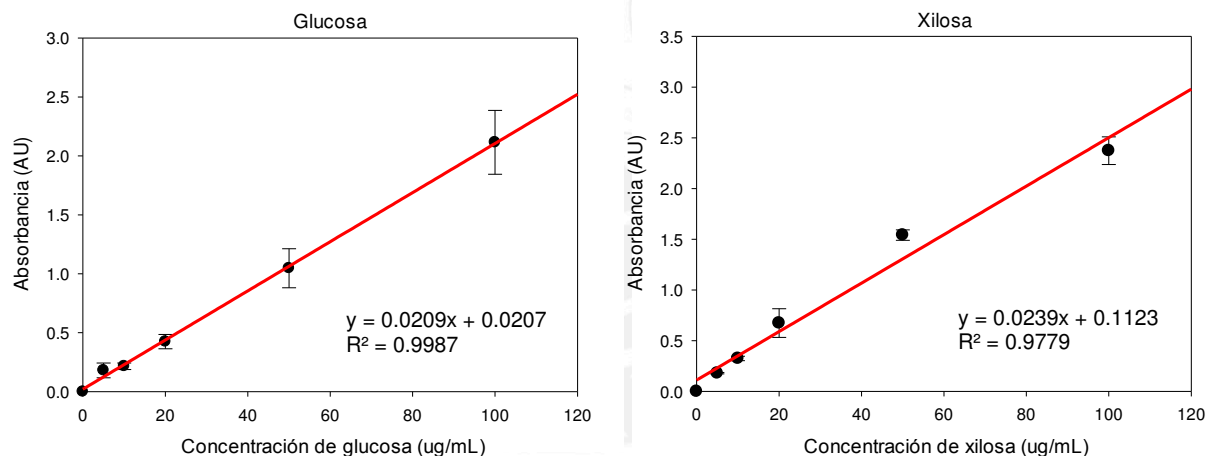


Figura 25. Curvas de calibración obtenidas para la cuantificación de celulosa (glucosa) y hemicelulosa (xilosa). Para ambas curvas se muestra la ecuación de la recta, el r^2 y el error estándar obtenido a partir de 3 repeticiones en cada punto.

Luego, se analizaron las muestras para hemicelulosa y celulosa. Para el primer caso, se tomaron ambas curvas de calibración porque la hemicelulosa es un polímero heterogéneo de diversos azúcares, tanto hexosas como pentosas, por lo que la cuantificación se realizó

con ambos tipos de azúcares. Para el caso de la celulosa sólo se tomó en cuenta la curva de glucosa.

Los resultados por este método se muestran en la tabla 6. Es posible observar que para los tres ensayos realizados no hay mucha variación significativa. Sin embargo, los valores obtenidos son un poco más bajos que los esperados, pues la celulosa es uno de los compuestos más abundantes de las plantas, junto con hemicelulosa y lignina.

Tabla 6. Resultados obtenidos por el método de antrona. El error se obtuvo de un promedio de 3 repeticiones por ensayo.

		<i>Calophyllum brasiliense</i>	<i>Bixa arborea</i>
Ensayo 1	% Celulosa	8,23 ± 0,28	9,45 ± 0,44
	%Hemicelulosa	5,46 ± 0,45	10,45 ± 0,78
Ensayo 2	% Celulosa	10,61 ± 0,84	10,59 ± 1,01
	%Hemicelulosa	7,28 ± 1,40	11,38 ± 0,84
Ensayo 3	% Celulosa	10,44 ± 0,54	9,56 ± 0,97
	%Hemicelulosa	5,17 ± 0,87	10,15 ± 1,08

3.6.2. Método de Van Soest y Robertson

El método de Van Soest y Robertson resultó un poco más largo, pero requería menos muestra y los resultados se podían obtener a partir del mismo tratamiento a las muestras y con reactivos menos peligrosos, por lo que se presentaba como una buena alternativa al otro procedimiento.

Los resultados se muestran en la tabla 7. A diferencia del caso de antrona, los valores son un poco más altos tanto para celulosa como hemicelulosa y el error permanece bajo.

Tabla 7. Resultados obtenidos por el método de Van Soest. El error se obtuvo de un promedio de 3 repeticiones por ensayo.

		<i>Calophyllum brasiliense</i>	<i>Bixa arborea</i>
Ensayo 1	% Celulosa	24,14 ± 1,35	21,64 ± 1,77
	%Hemicelulosa	9,62 ± 0,95	14,52 ± 2,13
Ensayo 2	% Celulosa	25,22 ± 1,22	23,45 ± 1,57
	%Hemicelulosa	10,45 ± 1,09	16,76 ± 1,44
Ensayo 3	% Celulosa	24,46 ± 1,15	20,22 ± 2,33
	%Hemicelulosa	10,06 ± 1,44	15,77 ± 1,27

Al comparar los resultados y los procedimientos, se decidió por trabajar con el método de Van Soest para todas las siguientes determinaciones y la cinética, ya que permitía analizar celulosa y hemicelulosa al mismo tiempo y utilizando menos cantidad de material vegetal. Los resultados obtenidos para la degradación de hemicelulosa a lo largo del tiempo se muestran en la figura 26 y para celulosa en la figura 27.

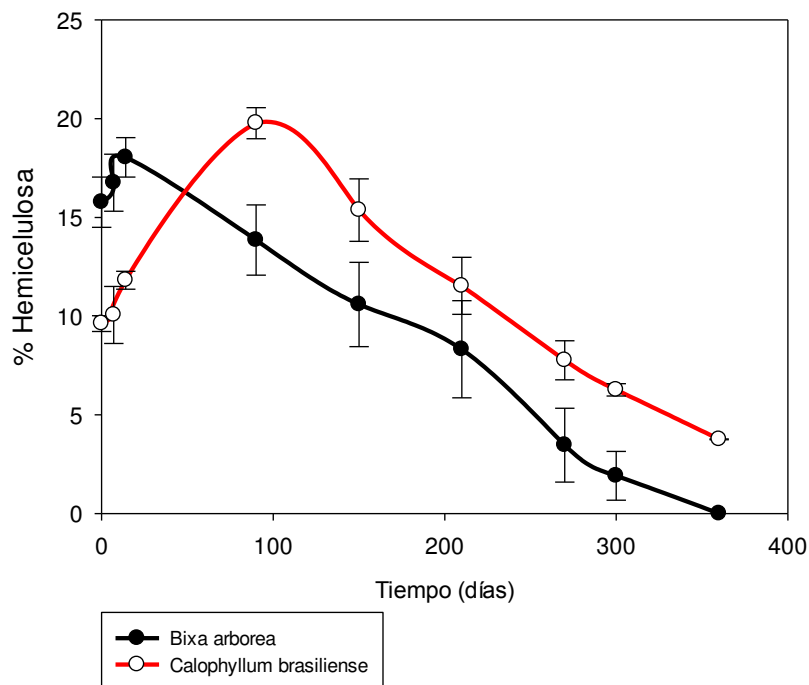


Figura 26. Contenido de hemicelulosa para las especies estudiadas. Cada punto se realizó por triplicado. En la figura se muestra el error estándar.

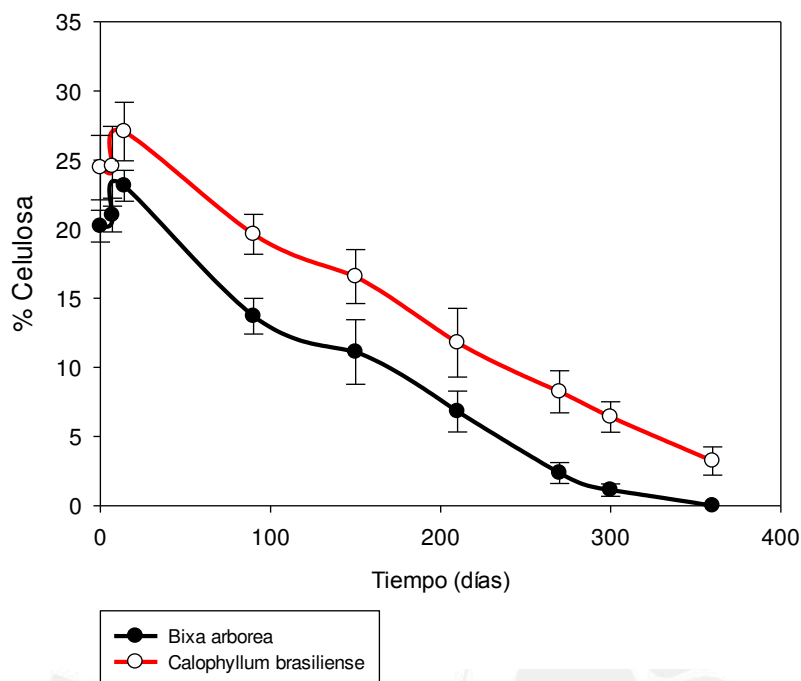


Figura 27. Contenido de celulosa para las especies de *Bixa arborea* y *Calophyllum brasiliense*. Cada punto se realizó por triplicado.

Para ambos casos es posible notar, inicialmente, un aumento en la concentración, tanto de celulosa como hemicelulosa, debido a la rápida desaparición de otros componentes, como por ejemplo polifenoles, taninos condensados, azúcares simples, etc. A partir del tercer mes, sin embargo, se ve ya una pérdida de estos compuestos hasta llegar a desaparecer completamente (en el caso de *Bixa arborea*).

3.7. Cuantificación de compuestos fenólicos

La cuantificación de compuestos fenólicos es posible gracias a la reacción de Folin-Ciocalteu, que se basa en la reacción de los polifenoles con la solución de Folin (mezcla de fosfomolibdato y fosfotungstato), la cual se reduce para dar la coloración azul-verdosa característica que se puede medir a 760 nm.

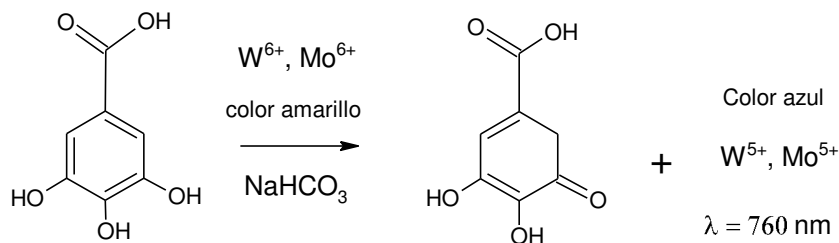


Figura 28. Reacción de formación del cromóforo a 760 nm para la cuantificación de polifenoles totales.

Se realizó una curva de calibración utilizando ácido gálico para poder cuantificar a los polifenoles presentes. La curva se muestra en la figura 29.

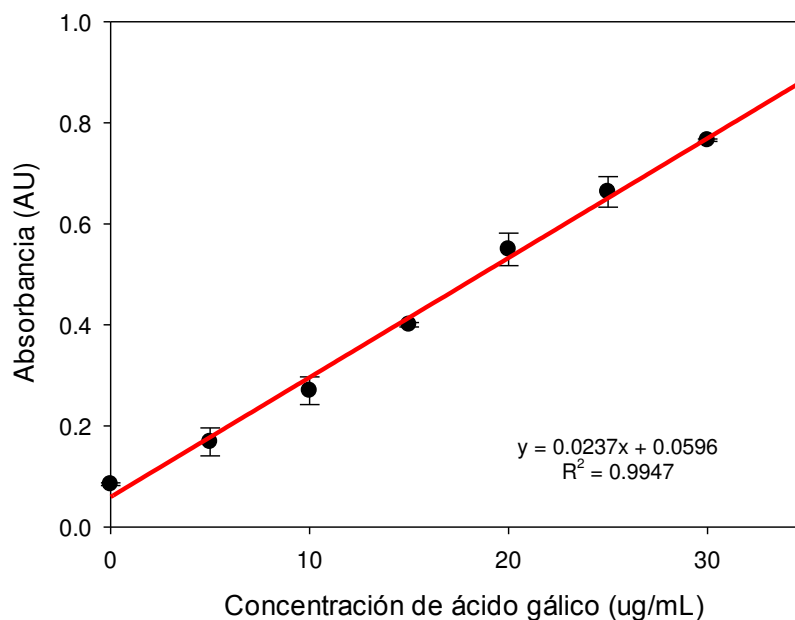


Figura 29. Curva de calibración de ácido gálico utilizada para la cuantificación de polifenoles totales. En la figura se muestra, además, la ecuación de la recta obtenida, el r^2 y el error estándar obtenido de 3 repeticiones.

El contenido de polifenoles se midió a lo largo del tiempo de descomposición y la curva obtenida se muestra en la figura 30.

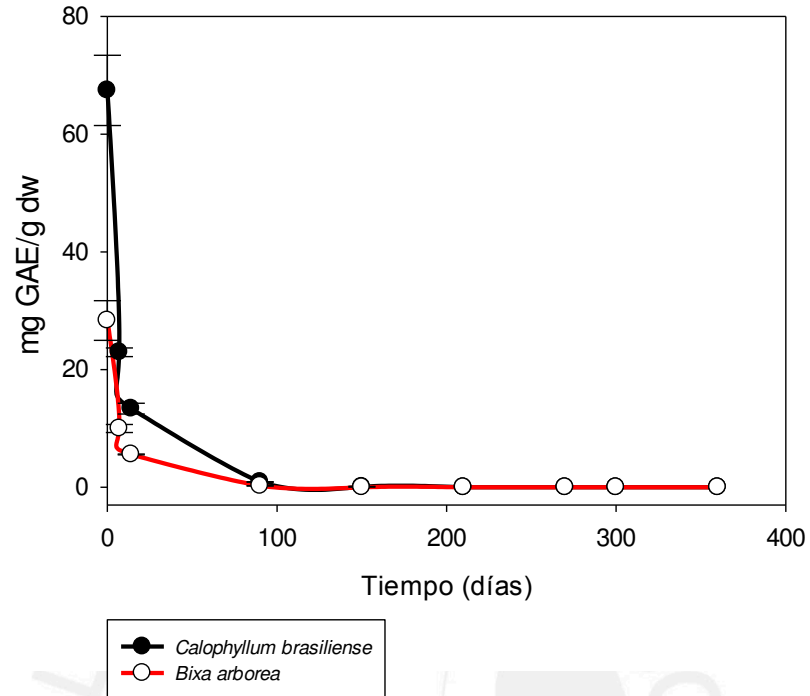


Figura 30. Contenido de polifenoles totales para ambas especies. Cada punto se realizó por triplicado. En la figura se muestra también el error estándar.

Se puede observar que el contenido de polifenoles totales es mayor para el caso de *Calophyllum brasiliense* que para *Bixa arborea*.

3.8. Cuantificación de taninos condensados

La formación del cromóforo que tiene una absorbancia a 545 nm se da por la reacción entre la vainillina y el tanino en medio ácido, como se muestra en la figura 31.

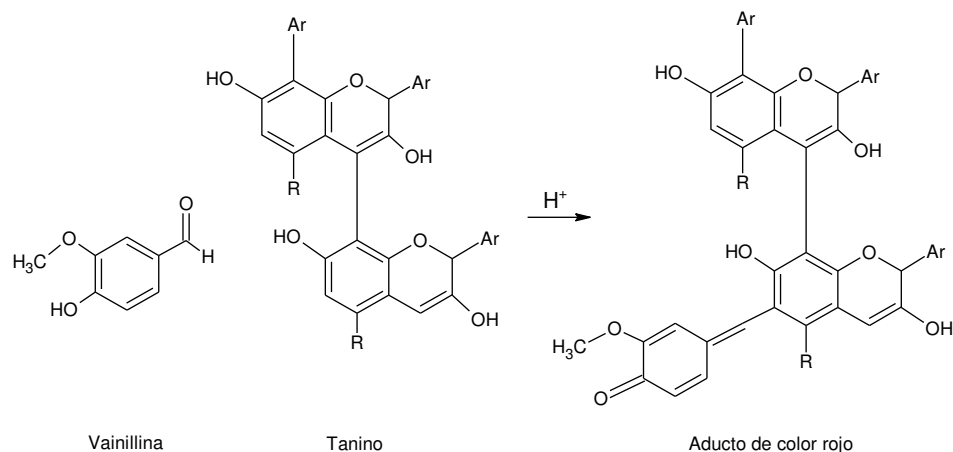


Figura 31. Reacción de formación del cromóforo al reaccionar la vainillina con un tanino condensado. La absorbancia máxima de este compuesto es 500 nm.

Para la cuantificación de taninos condensados, se utilizó una curva de calibración con catequina, que se muestra a continuación.

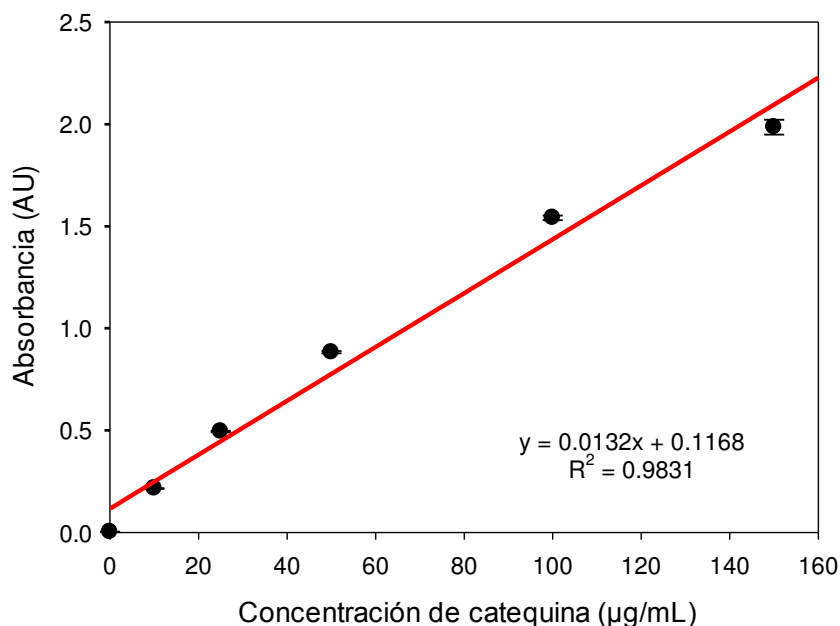


Figura 32. Curva de calibración de catequina utilizada para la cuantificación de taninos condensados. En la figura se muestra, además, la ecuación de la recta obtenida, el r^2 y el error estándar obtenido de 3 repeticiones.

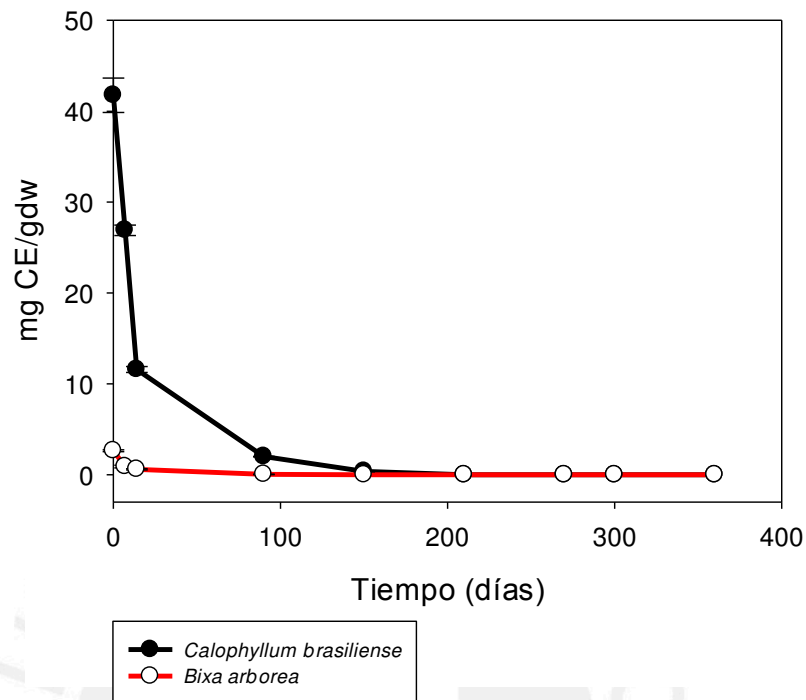


Figura 33. Contenido de taninos condensados para ambas especies.

En la figura 33 es posible observar la gran diferencia que hay para ambas especies. *Bixa arborea* casi no presenta taninos condensados (2,64mg CE/g dw) mientras que *Calophyllum* presenta una alta cantidad (41,76mg CE/g dw).

Estos compuestos cumplen una serie de funciones en las plantas, entre las que destaca la de mecanismo de defensa. Es así que un menor contenido de taninos condensados favorecerá la descomposición, y un alto nivel de estos compuestos protegerá a la planta.

3.9. Análisis cualitativo de compuestos fenólicos

3.9.1. Análisis por GC-MS

Se analizaron los extractos acuosos y orgánicos de cada especie. Sin embargo, en los cromatogramas de la fase acuosa no se pudo observar la presencia de compuestos fenólicos, tan sólo de ácidos carboxílicos y azúcares. Los cromatogramas de las fases orgánicas se muestran en las figuras 34 (*Calophyllum brasiliense*) y 35 (*Bixa arborea*). Para ambos casos fue posible identificar los polifenoles con la ayuda de la base de datos de referencia NIST.

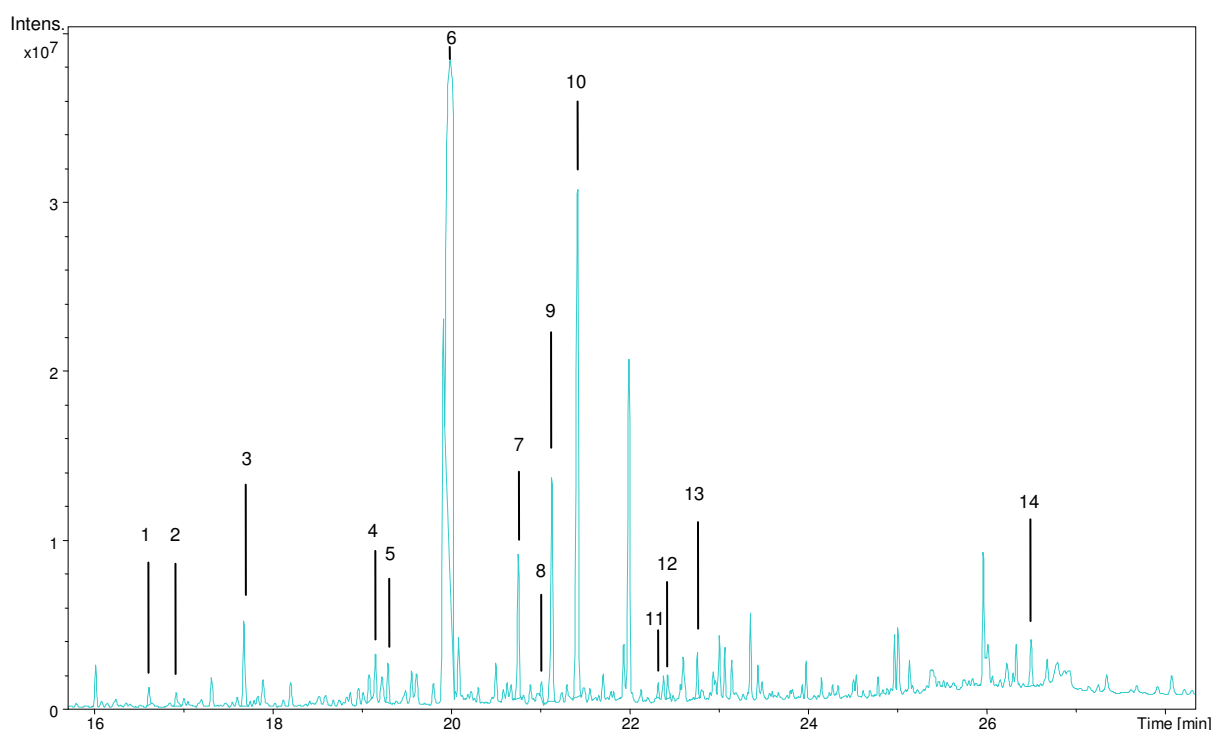


Figura 34. Cromatograma GC-MS obtenido de la muestra de *Calophyllum brasiliense*. Se identificaron los compuestos fenólicos por comparación con la base de datos NIST 2011: 1. Ácido cinámico (RT= 16,64 min.), 2. Ácido m-hidroxibenzoico (RT= 16,93 min.), 3. Ácido p-hidroxibenzoico (RT= 17,69 min.), 4. Ácido fenilacético (RT= 19,09 min.), 5. Ácido anísico (RT= 19,30 min.), 6. Ácido protocatéquico (RT= 19,99 min.), 7. Ácido siríngico (RT= 20,75 min.), 8. Ácido 2,3,4-trihidroxibenzoico (RT= 21,01 min.), 9. Ácido p-cumárico (RT= 21,13 min.), 10. Ácido benzoico (RT= 21,41 min.), 11. Catecol (RT= 22,31 min.), 12. Ácido ferúlico (RT= 22,41 min.), 13. Ácido cafeico (RT= 22,75 min.), 14. Catequina (RT = 26,48 min.)

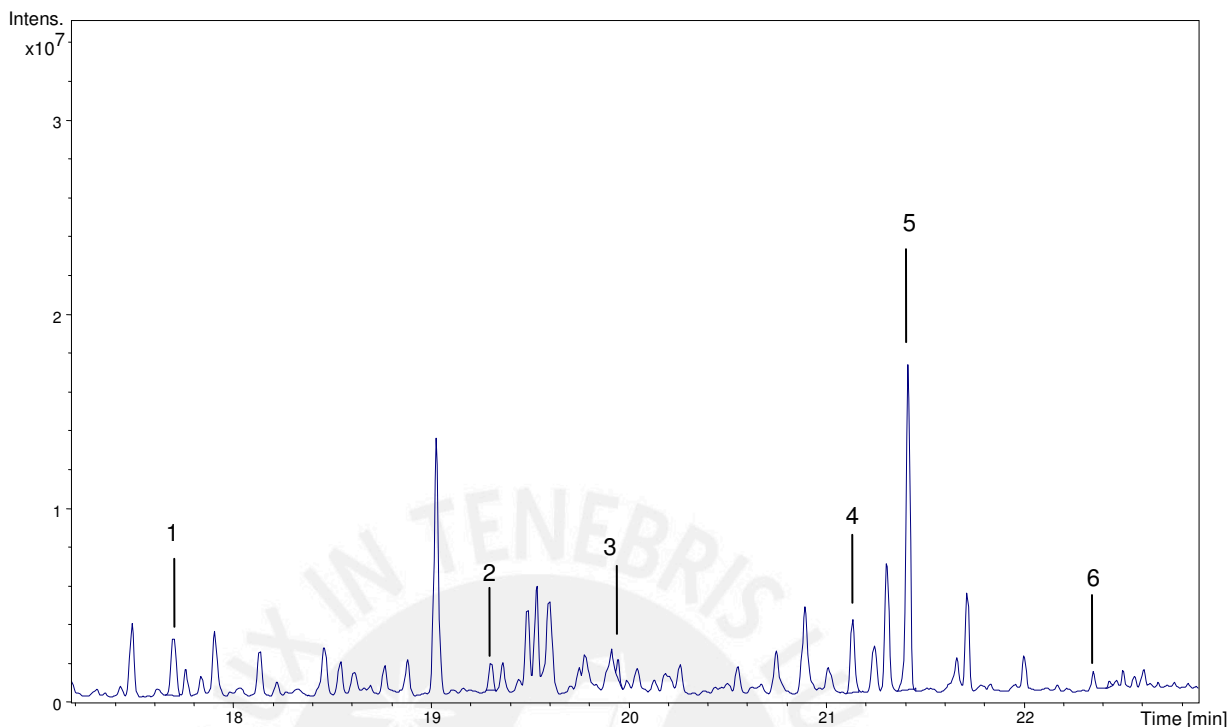


Figura 35. Cromatograma GC-MS obtenido de la muestra de *Bixa arborea*. Se identificaron los compuestos fenólicos por comparación con la base de datos NIST 2011. 1. Ácido p-hidroxibenzoico (RT= 17,71 min.), 2. Ácido anísico (RT= 19,31 min.), 3. Ácido protocatéquico (RT= 19,94 min.), 4. Ácido p-cumárico (RT= 21,13 min.), 5. Ácido benzoico (RT= 21,41 min.), 6. Ácido cinámico (RT= 22,43 min.)

Las diferencias entre ambas especies saltan a la vista de manera inmediata. El contenido de compuestos fenólicos en *Calophyllum brasiliense* es mayor al de *Bixa arborea*. No sólo en cantidad, sino también en contenido. Es así que en *Bixa* sólo se pudieron identificar seis compuestos, mientras que en *Calophyllum* se reportan 14.

3.9.2. Análisis por LC-MS

Como se mencionó anteriormente, el análisis por LC-MS es más sencillo pues no precisa de una derivatización pre-columna a diferencia de cromatografía de gases. Sin embargo, debido a la falta de una base de datos interna de compuestos fenólicos, la identificación de los mismos resultó un poco más complicada. A continuación se muestran los cromatogramas conseguidos para ambas especies. Los polifenoles

fueron identificados al comparar el espectro UV y las fragmentaciones obtenidas con estándares y bases de datos externas.

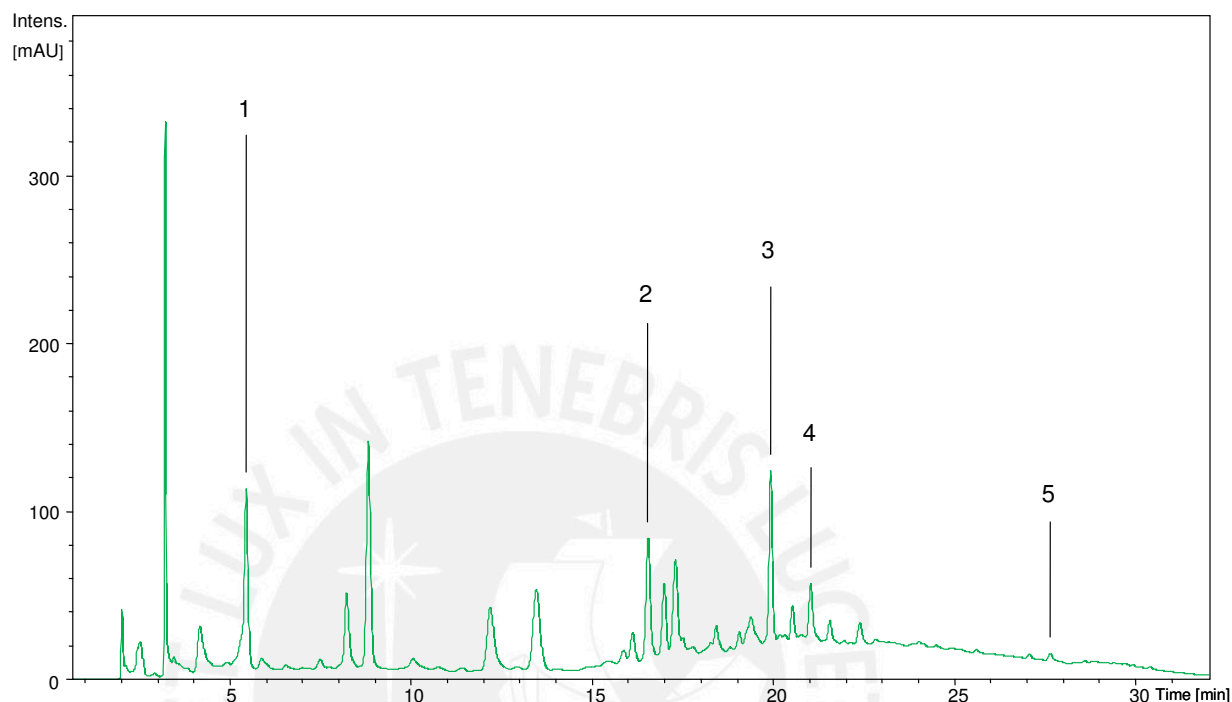


Figura 36. Análisis de la muestra de *Calophyllum brasiliense* por LC-MS. Se logró identificar a los siguientes fenólicos: 1: ácidos gálico (RT= 5,5 min), 2: cafeico (RT= 16,6 min), 3: cumárico (RT= 20,0 min), 4: ferúlico (RT= 21,1 min) y 5: cinámico (RT= 27,8 min). Los compuestos fueron identificados por comparación de los tiempos de retención con estándares, las fragmentaciones obtenidas por el espectrómetro de masas y por su absorbancia a 280 nm.

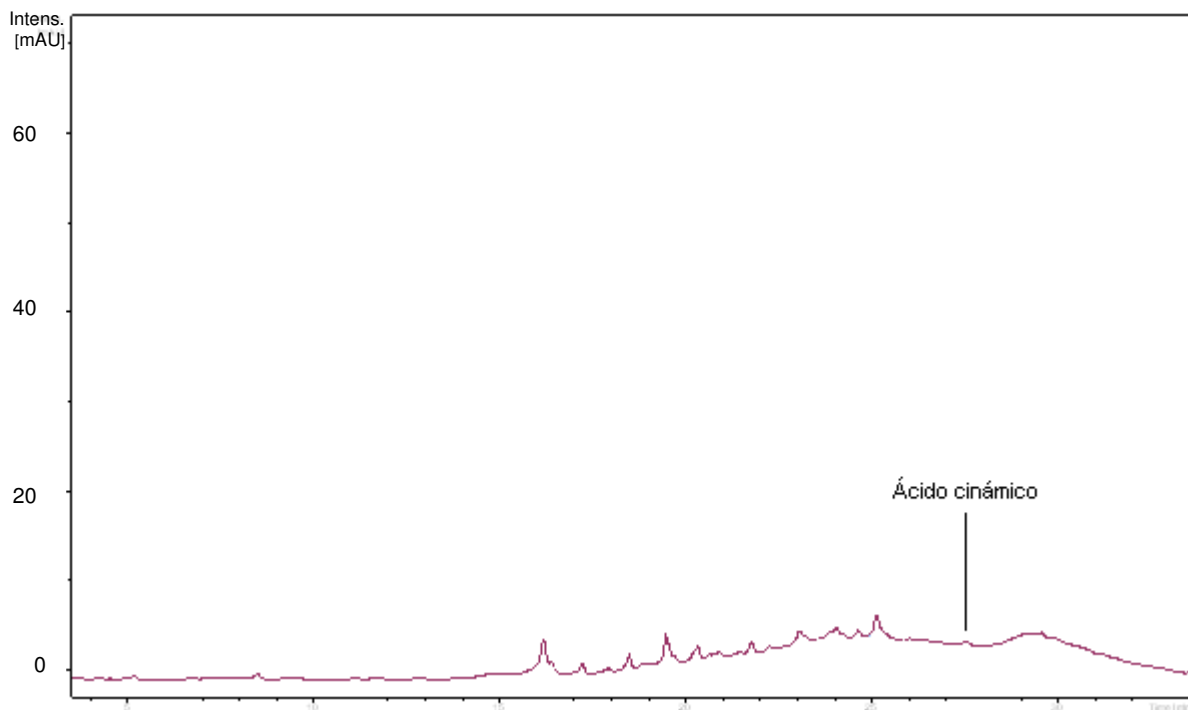


Figura 37. Análisis de la muestra de *Bixa arborea* por LC-MS. Únicamente se pudo identificar la presencia de ácido cinámico (RT= 27,9 min).

3.10. Cuantificación de calcio y fósforo

Se realizaron curvas de calibración para poder determinar los contenidos de fósforo y calcio de las muestras. Para el caso del fósforo se utilizó fosfato de potasio monobásico y para el calcio se utilizó cloruro de calcio.

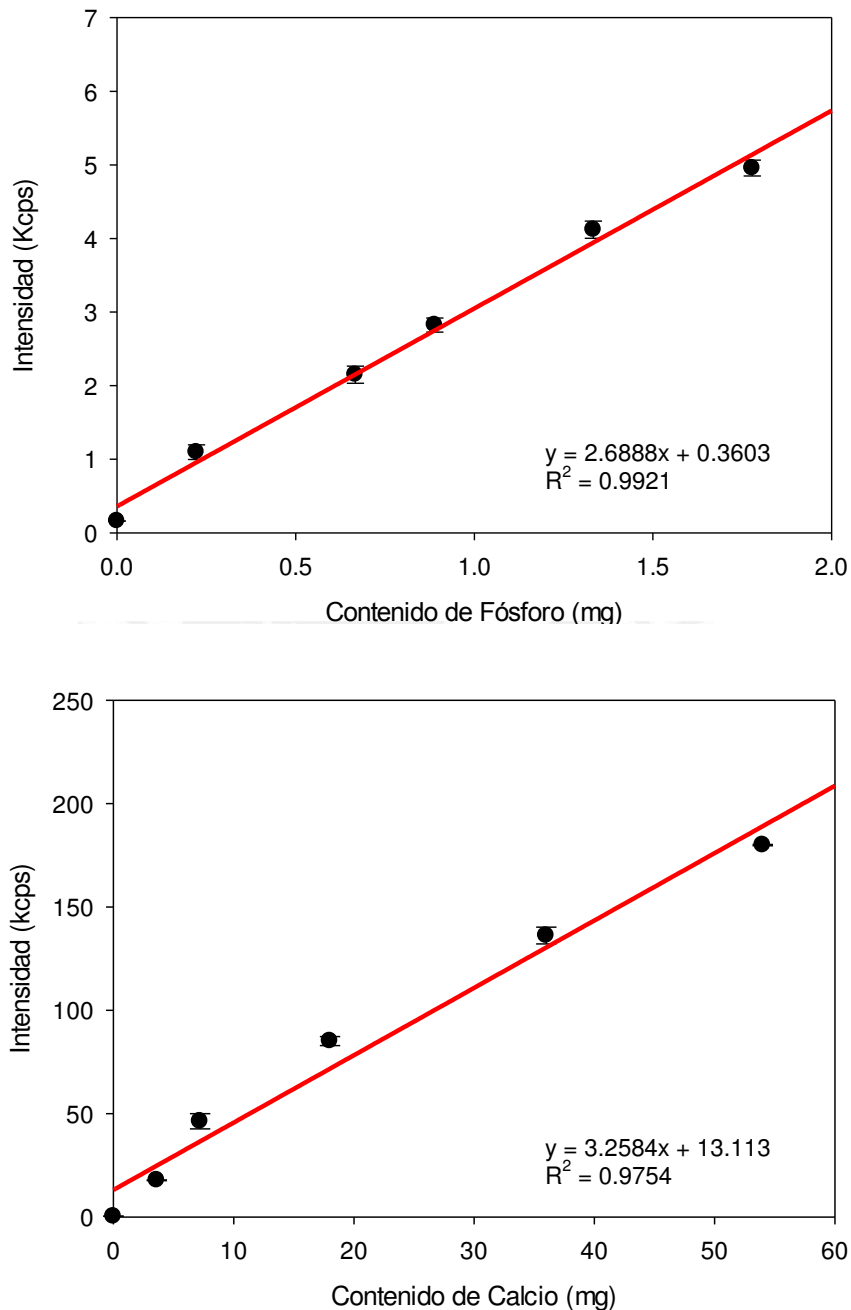


Figura 38. Curvas de calibración de fósforo (superior) y calcio (inferior) para la cuantificación de estos elementos en las especies vegetales. Todos los puntos son un promedio de tres repeticiones. En la figura se muestran los valores de la regresión y el error estándar, así como el r^2 . En ambos casos se utilizó el software Spectra® para la cuantificación.

Para las dos curvas, se trató de emular la matriz de la planta, por lo que estos compuestos fueron mezclados con celulosa. Inicialmente la mezcla de los dos sólidos se realizó en un mortero, pero esto llevó a problemas de homogeneidad en las pastillas preparadas y a una gran diferencia en los resultados obtenidos en cada muestra. Por esa razón, se prepararon los estándares de diferentes concentraciones al disolver una cantidad conocida de las sales en agua milliQ y luego mezclarlas con celulosa.

Finalmente, para medir el contenido de fósforo y calcio en las plantas se colocaron las muestras en una estufa a 80°C y se dejaron secar por toda la noche. Una vez secas, se prensaron en pastillas y se realizó la medición como se menciona en la sección 2.2.6.

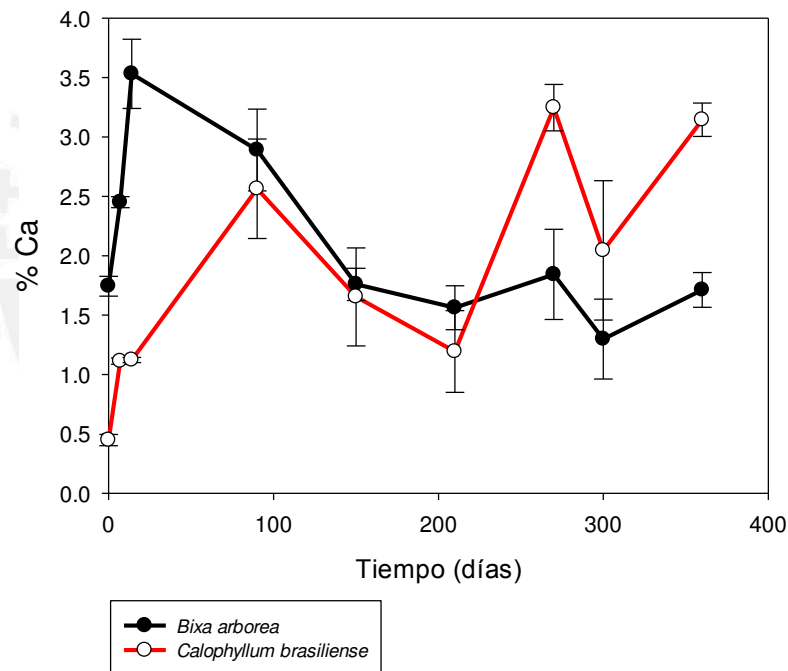


Figura 39. Contenido de calcio para ambas especies. Cada punto se realizó por triplicado.

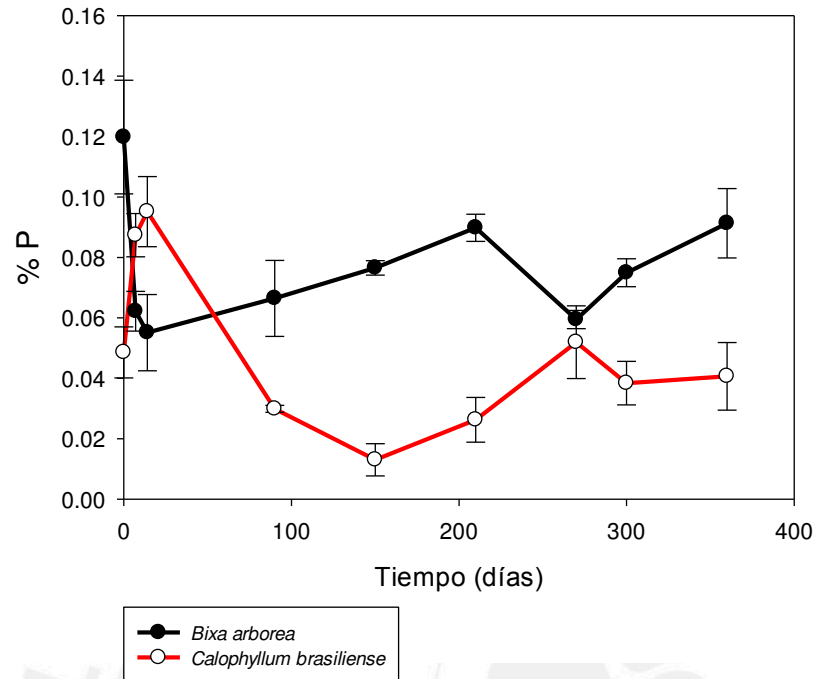


Figura 40. Contenido de fósforo para ambas especies. Cada punto se realizó por triplicado.

En ambos casos, es posible observar que el contenido de fósforo y calcio es mayor para *Bixa arborea* con respecto a *Calophyllum* (figuras 39 y 40).

Para el calcio, vemos primero un incremento, seguido de una caída gradual para ambas especies. El incremento en este elemento puede deberse a hongos heterótrofos que toman el calcio del suelo del bosque y lo trasladan a la hojarasca, donde es inmovilizado.

Las variaciones en el fósforo se pueden explicar de la misma manera que en el caso del calcio. Los organismos descomponedores fijan o liberan el fósforo del suelo a la planta o viceversa, de manera que aumenta o disminuye su concentración en la planta.

Además, se ha reportado (Crang y col., 1968; Reich y col., 2005) que a un mayor contenido de diferentes macroelementos, la descomposición se verá acelerada, por lo

que también podría explicar la resistencia de *Calophyllum* a la descomposición, quien tiene valores iniciales más bajos de estos macroelementos que *Bixa*.

3.11. Correlación de los parámetros estudiados

La correlación de los parámetros estudiados se realizó con la ayuda del programa SigmaPlot versión 11. Se utilizó una correlación de Pearson y los resultados se muestran en las tablas 8 y 9.

En primer lugar, se puede observar que, para ambas especies, existe una correlación negativa entre el porcentaje de peso perdido y el contenido de carbono, nitrógeno y celulosa, y una correlación positiva entre el peso perdido y el contenido de lignina.

Para *Calophyllum brasiliense*, además, se encontró una correlación entre el peso perdido y el contenido de taninos condensados, que no se observa para el caso de *Bixa arborea*.

Otra correlación interesante es la de lignina con calcio, que sólo se observa en *Calophyllum*. Anteriormente ya se ha reportado que el calcio está involucrado en la polimerización de la lignina en la pared celular (Westermarck, 1982). También es interesante la correlación entre lignina y celulosa, puesto que diversas hipótesis sugieren que la lignina puede actuar como una barrera ante la descomposición de celulosa y hemicelulosa en la pared celular.

Tabla 8. Tabla de correlación para *Calophyllum brasiliense*. PP, peso perdido por la descomposición; C, carbono; N, nitrógeno; P, fósforo; Ca, calcio; Lig, lignina; Hem, hemicelulosa; Cel, celulosa. Los valores resaltados son aquellos cuyos coeficientes de correlación son $p < 0,05$.

Parámetro	Pearson	%C	%N	P	Ca	%Lig	%Hem	%Cel	% Polif.	%Taninos
%PP	r	-0.956	-0.754	-0.408	0.714	0.959	-0.632	-0.981	-0.591	-0.678
	p	5.59E-05	0.0189	0.276	0.0306	4.33E-05	0.068	3.02E-06	0.0935	0.0448
	n	9	9	9	9	9	9	9	9	9
%C	r		0.852	0.555	-0.698	-0.946	0.477	0.98	0.685	0.779
	p		3.57E-03	0.121	0.0364	1.13E-04	0.194	3.58E-06	0.0419	0.0134
	n		9	9	9	9	9	9	9	9
%N	r			0.751	-0.67	-0.781	0.0779	0.815	0.746	0.84
	p			0.0197	0.0481	0.0129	0.842	7.43E-03	0.0211	4.61E-03
	n			9	9	9	9	9	9	9
%P	r				-0.289	-0.316	-0.226	0.536	0.318	0.478
	p				0.45	0.407	0.559	0.137	0.404	0.193
	n				9	9	9	9	9	9
%Ca	r					0.809	-0.207	-0.732	-0.677	-0.708
	p					8.23E-03	0.594	0.0249	0.0453	0.0328
	n					9	9	9	9	9
%Lig	r						-0.549	-0.943	-0.727	-0.781
	p						0.126	1.36E-04	0.0266	0.013
	n						9	9	9	9
%Hem	r							0.547	-0.0696	-0.0451
	p							0.127	0.859	0.908
	n							9	9	9
%Cel	r								0.599	0.693
	p								0.0886	0.0384
	n								9	9
%Polif.	r									0.963
	p									3.16E-05
	n									9

Tabla 9. Tabla de correlación para *Bixa arborea*. PP, peso perdido por La descomposición; C, carbono; N, nitrógeno; P, fósforo; Ca, calcio; Lig, lignina; Hem, hemicelulosa; Cel, celulosa. Los valores resaltados son aquellos cuyos coeficientes de correlación son $p < 0,05$.

Parámetro	Pearson	%C	%N	P	Ca	%Lig	%Hem	%Cel	% Polif.	%Taninos
%PP	r	-0.964	-0.932	0.00967	-0.666	0.903	-0.986	-0.981	-0.645	-0.656
	p	2.76E-05	2.48E-04	0.98	0.0504	8.53E-04	1.08E-06	3.30E-06	0.0605	0.0552
	n	9	9	9	9	9	9	9	9	9
%C	r		0.878	0.0323	0.599	-0.941	0.952	0.98	0.73	0.74
	p		1.87E-03	0.934	0.0886	1.52E-04	7.77E-05	3.96E-06	0.0256	0.0227
	n		9	9	9	9	9	9	9	9
%N	r			0.0236	0.527	-0.793	0.958	0.909	0.52	0.528
	p			0.952	0.145	0.0109	4.62E-05	6.84E-04	0.152	0.144
	n			9	9	9	9	9	9	9
%P	r				-0.562	-0.307	-0.0928	-0.0594	0.6	0.591
	p				0.116	0.421	0.812	0.879	0.0873	0.0939
	n				9	9	9	9	9	9
%Ca	r					-0.373	0.702	0.697	0.0389	0.0623
	p					0.322	0.0351	0.037	0.921	0.874
	n					9	9	9	9	9
%Lig	r						-0.843	-0.888	-0.903	-0.907
	p						4.29E-03	1.40E-03	8.36E-04	7.29E-04
	n						9	9	9	9
%Hem	r							0.984	0.55	0.562
	p							1.78E-06	0.125	0.115
	n							9	9	9
%Cel	r								0.626	0.638
	p								0.0715	0.0642
	n								9	9
%Polif.	r									0.999
	p									1.08E-11
	n									9

4. DISCUSIÓN

La Amazonía es una de los ecosistemas más importantes del planeta por la relación que hay entre el ciclo del carbono y el sistema climático que afecta a todo tipo de vida. Mientras que el papel de ésta en el ciclo del carbono es de importancia mundial, el comportamiento exacto de la Amazonía es discutible, y los modelos que hasta el momento se han utilizado, varían sustancialmente de acuerdo a los parámetros utilizados para las mediciones.

Actualmente se conocen dos funciones potenciales de la Amazonía; la primera considera que puede actuar como un amortiguador del cambio climático al almacenar el carbono emitido por las diferentes fuentes y, posiblemente, secuestrar de la carbón adicional de la atmósfera; la segunda considera que puede acelerar peligrosamente el cambio climático al liberar grandes cantidades de carbono a la atmósfera, ya sea por respiración, descomposición o por la quema de los árboles, con lo cual tendría una influencia en el clima de una manera que podría resultar catastrófica para las áreas protegidas y para la biodiversidad mundial, incluido el bien de nuestra propia especie (RAINFOR, 2010). Estas dos funciones generan muchas discusiones con relación a la importancia de los bosques de la Amazonía en las estrategias de mitigación del cambio climático. Estas estrategias dependen de modelos predictivos para los cuales, a su vez, son esenciales los estimados de los procesos biológicos del ciclo de carbono como, por ejemplo, la captación de carbono por fotosíntesis, crecimiento de las plantas y descomposición de la materia orgánica (Hättenschwiler, 2010).

Si bien es cierto que los ecólogos han hecho varios estudios sobre tasas de desaparición de biomasa y análisis simples de contenidos de distintos indicadores en hojarascas, la dinámica de los procesos de degradación está aún en proceso de caracterización (Hättenschwiler, 2010). Los modelos de carbono, tanto el biogeoquímico como el global, están basados en las variables climáticas así como en los conductores de la fotosíntesis y descomposición, y de características de las plantas como indicadoras de limitaciones ecológicas y evolutivas en los procesos bioquímicos y biofísicos (Hättenschwiler, 2010).

Hasta el momento se han realizado diversos experimentos comparativos de descomposición y de captación de carbono atmosférico, pero se han encontrado grandes limitaciones al no considerar varios factores importantes como, por ejemplo, la contribución de la macro y microfauna que se encuentra en los suelos de los bosques, estos organismos son claves en la regulación de la descomposición de la hojarasca, y rara vez son considerados en los experimentos y así son excluidos de los modelos a pesar de que se tienen evidencias de su importante papel en sistemas tropicales. (Lavelle y Spain, 2001; González y Seastedt, 2001; Wall, 2008; Hättenschwiler, 2010)

Por esta razón, uno de los principales objetivos fue el de analizar la variación de diferentes marcadores químicos a lo largo del proceso de descomposición, y, consecuentemente, ayudar a sentar las bases para futuras investigaciones sobre estrategias de mitigación del cambio climático.

Para lograr los objetivos de esta tesis, como se mencionó anteriormente, se analizaron los metabolitos secundarios de las plantas, lignina, celulosa, hemicelulosa, carbono, nitrógeno, fósforo y calcio en un período de 12 meses. Los principales resultados, así como la metodología utilizada para el análisis de los mismos, se discuten a continuación.

4.1. Técnica de bolsas de descomposición

Se utilizó el método de bolsas de degradación o “litterbags” para determinar la constante de descomposición de cada especie. Esta es una técnica ampliamente usada para este tipo de análisis pues permite emular la descomposición de las hojas en el suelo del bosque.

Se obtuvo una constante de descomposición de $0,57 \text{ año}^{-1}$ para *Calophyllum brasiliense* y $1,46 \text{ año}^{-1}$ para *Bixa arborea*. Estos números no son algo novedoso pues a simple vista era posible observar que las hojas de *Bixa*, a pesar de ser más grandes, eran más finas y delgadas que las hojas de *Calophyllum*, que eran gruesas y duras al tacto. Es necesario mencionar que los valores son resultado de la diferencia de peso entre el contenido inicial de la bolsa y el que tenía al momento de ser recolectada y

que, lamentablemente, no se pudieron realizar replicados de las bolsas debido a la falta de material, por lo que estadísticamente no son significativos. Sin embargo, al comparar con los valores obtenidos en Salinas y col. (2011), se puede ver cierta similitud, por lo que se podría decir que se cumplió el objetivo de determinar la constante de descomposición mediante la técnica de bolsas de descomposición.

Cabe resaltar que esta técnica puede dar resultados bastante precisos, aunque tiene algunas debilidades. Por ejemplo, hay algunos macro invertebrados que son excluidos de los cálculos de descomposición. Asimismo, puede haber contaminación con la materia orgánica que ya está presente en el suelo, por lo que se requiere ser cuidadoso al momento de limpiar el material. Finalmente, es necesario revisar que las bolsas no alteren el microclima o las condiciones de descomposición del lugar.

Otro factor que afecta las mediciones por este método es el tamaño de poro de la bolsa, pues depende del tipo de descomposición que se quiere analizar. Generalmente se prefiere un tamaño que permita el acceso de todos los organismos a la hojarasca y a la vez, que minimice la cantidad de pérdida de partículas (Robertson y Paul, 1999). En este trabajo se utilizaron bolsas con tamaño de poro de 1 mm. Se eligió este tamaño pues se quería analizar el efecto de los microorganismos y se prefirió excluir a la macrofauna para disminuir el número de variables que pudieran afectar la descomposición.

El tamaño, material y el contenido de las bolsas es también importante. La fibra de vidrio es recomendada para lugares donde hay una gran intensidad de rayos UV que pueda degradar otros materiales. También se han reportado estudios con bolsas de polipropileno y nylon (Harmon y Lajtha 1999). Con respecto al tamaño de la bolsa, este varía de acuerdo al experimento y el lugar donde se colocarán las bolsas. Normalmente se utilizan bolsas de 20x20 cm (Robertson y Paul, 1999), aunque depende de la comunidad de plantas que se desee estudiar y el tamaño de hojas. Para los fines de este trabajo se utilizaron bolsas de nylon de 30x30 cm. El nylon es un material bastante resistente y que, además, no iba a interferir con las mediciones. Por otro lado, se decidió tomar un tamaño de 30x30 cm ya que las hojas de *Bixa arborea* eran bastante grandes y se quería evitar doblarlas o romperlas al colocarlas dentro de las bolsas.

Inicialmente fue bastante fácil retirar el material de hojas de las bolsas y limpiarlo para el análisis, pues al recogerlas del suelo del bosque se encontraban en un buen estado. Sin embargo, a medida que pasaba el tiempo y las condiciones climáticas cambiaban, las bolsas se empezaron a deteriorar, tanto así que algunas estaban rotas y el material se había contaminado con el suelo del bosque o, a veces, estaban mojadas y tenían barro adherido que era difícil de separar y que contaminaba el material también. Asimismo, diversas raíces y micorrizas habían crecido en las bolsas y a veces se metían entre los poros y llegaban hasta el material.

Para futuros análisis por medio de esta técnica sería recomendable utilizar bolsas de un material más resistente para evitar las rupturas que puedan contaminar el material que se encuentra dentro de las bolsas.

Además, para los fines de este trabajo, se utilizaron bolsas de descomposición para *Calophyllum brasiliense* y *Bixa arborea* separadas en parcelas distintas. En el ciclo natural de descomposición, sin embargo, no se discrimina entre especies y se tiene una hojarasca heterogénea, que se va degradando toda junta y que, probablemente, tiene propiedades diferentes a las que tendría si el material fuese estudiado de manera independiente. Es por ello que, para futuras investigaciones, sería interesante estudiar el efecto que tiene juntar ambas especies en las mismas bolsas y comparar la constante de descomposición con la obtenida en este estudio.

4.2. Temperatura y humedad

El presente trabajo también proponía analizar la correlación existente entre las variables climáticas, como son temperatura y humedad, con la descomposición de las hojas. Esto se debe a que son parámetros importantes que pueden modificar la naturaleza y rapidez de la descomposición pues afectan directamente el desarrollo del recubrimiento de la planta y la actividad de los microorganismos (Brinson, 1977). Sin embargo, debido a las condiciones ambientales en las que se encontraba, el sensor colocado presentó fallas durante todo el tiempo de muestreo y los pocos datos obtenidos no fueron suficientes para realizar los cálculos estadísticos.

4.3. Polifenoles totales y taninos condensados

Con respecto a los polifenoles es posible decir que, como se explicó anteriormente, están considerados como biológicamente activos, protegiendo a la planta contra estrés biótico, como microbios o herbívoros, o estrés abiótico, como contaminación del aire y suelo, iones de metales pesados y radiación UV. Los taninos condensados, por ejemplo, pueden limitar la descomposición de diferentes maneras: 1) siendo ellos mismos resistentes a la descomposición, 2) secuestrando proteínas en complejos proteína-tanino que son resistentes a la descomposición, 3) protegiendo a otros compuestos, como celulosa y hemicelulosa de ataques microbianos, 4) por toxicidad directa a los microorganismos y 5) acomplejando o desactivando exoenzimas microbianas (Rahman y Rahman, 2012). Es así que este tipo de compuestos son el primer mecanismo de defensa de las plantas y son degradados rápidamente en los primeros días de descomposición.

Para analizar el contenido de polifenoles totales se utilizó el método de Folin-Ciocalteu, y para cuantificar taninos condensados se utilizó el método de vainillina – HCl. Ambos métodos son ampliamente usados para determinar este tipo de compuestos y no se tuvo ningún problema al realizar los análisis.

Los contenidos de polifenoles totales y taninos condensados varían significativamente según la especie de estudio. *Calophyllum brasiliense* mostró un contenido mayor tanto de polifenoles totales como de taninos ($6,71 \pm 0,59\%$ y $4,18 \pm 0,18\%$ respectivamente) con respecto a *Bixa arborea* ($2,83 \pm 0,37\%$ y $0,26 \pm 0,01\%$) esto podría ser una posible explicación a la diferencia en el tiempo de descomposición de ambas especies.

Los polifenoles son conocidos por su actividad en la degradación del material vegetal. Muchas veces su impacto es bastante mayor al del contenido de lignina y nitrógeno (Palm y Sánchez, 1990). En la figura 41, por ejemplo, se puede observar que los compuestos fenólicos solubles enfrentan cuatro posibles destinos en el suelo. Pueden ser degradados y mineralizados por microorganismos heterotróficos como una fuente de carbono, pueden ser transformados en sustancias húmicas insolubles y recalcitrantes por reacciones de polimerización y condensación (con la contribución de los organismos del suelo). Asimismo, es posible que formen quelatos con los iones Al^{3+}

o Fe^{2+} del suelo, o que se adsorban a los minerales de la arcilla. Finalmente, es probable, también, que permanezcan en su forma disuelta y sean arrastrados por el agua de lluvias y dejen el ecosistema como parte de carbono orgánico disuelto.

La fracción insoluble de los polifenoles, por otro lado, entra al suelo como hojarasca. Algunos productos solubles son liberados debido a la descomposición microbiana de la parte insoluble, contribuyendo al sumidero total de compuestos fenólicos solubles. Adicionalmente, la ruptura de lignina, así como la síntesis microbiana de compuestos no fenólicos, también pueden contribuir a la acumulación de polifenoles en el suelo.

Algunos grupos de la fauna del suelo son capaces de digerir los compuestos fenólicos (al menos en parte, como los gusanos de tierra y las termitas), pero la mayoría de los polifenoles no digeridos son mezclados con otros componentes de la hojarasca, microorganismos y minerales durante su paso por el intestino, así, aceleran la degradación microbiana y la formación de complejos organo-minerales.

Con lo que respecta a los organismos del suelo, los compuestos fenólicos pueden afectar directamente la composición y la actividad de las comunidades descomponedoras, de manera que influyen también en las velocidades de descomposición y el ciclaje de nutrientes.

Los polifenoles también pueden interactuar con el ciclo de nutrientes en diferentes maneras. Estas interacciones se dan, principalmente, entre los polifenoles, los microorganismos y los sumideros de elementos como nitrógeno, fósforo y calcio. Por ejemplo, los polifenoles influyen en los microorganismos encargados de las transformaciones del nitrógeno en su ciclo (especialmente en la nitrificación) y pueden alterar la disponibilidad del nitrógeno en el suelo al acomplejarse con proteínas. Estos complejos, conocidos como PPC (complejos polifenol-proteína) se originan durante la senescencia del material vegetal, cuando los polifenoles almacenados en las vacuolas entran en contacto con las proteínas del citoplasma, o cuando acomplejan con proteínas que provienen de la hojarasca y/o de enzimas extracelulares de los microorganismos. Es así que los PPC son altamente resistentes a la descomposición (Bajwa, 1985).

Asimismo, los compuestos fenólicos también tienen una influencia sobre el destino de algunos nutrientes, aunque por otros mecanismos. Estos pueden adsorberse en minerales de arcilla y acomplejar con sesquióxidos y así protegerse del ataque microbiano. A su vez, estas interacciones pueden prevenir la adsorción de iones fosfato por parte del suelo y, en algunos casos, se ha demostrado que pueden desorber fosfatos previamente enlazados a los sesquióxidos. Así, un alto contenido de polifenoles puede contribuir al mantenimiento de la disponibilidad de P en los suelos. Los compuestos fenólicos también pueden retener algunos cationes inorgánicos intercambiables, como el calcio, magnesio y potasio, al proveer sitios de adsorción en suelos ácidos y mantener la disponibilidad de estos elementos (Zech y col., 1997).

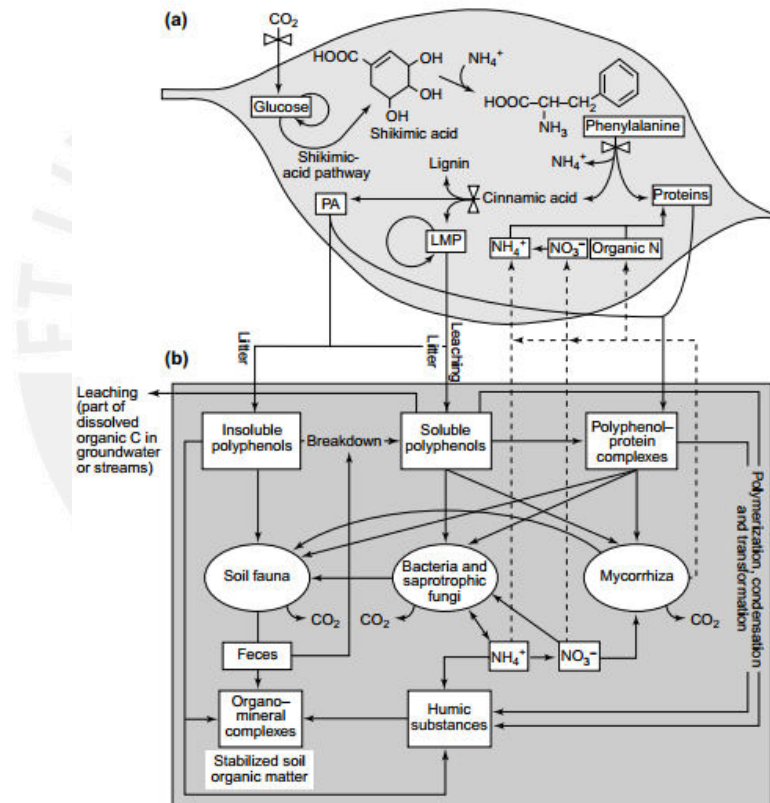


Figura 41. Diagrama simplificado de un camino de la biosíntesis de polifenoles. (a) Representa cualquier tejido vegetal vivo y la liberación y destino de los compuestos sintetizados al ambiente. (b) Las líneas continuas indican los caminos biosintéticos de los polifenoles y sus flujos y transformaciones en el suelo. Las líneas punteadas, por otro lado, indican la toma de nitrógeno por parte de la planta. (Fuente: Hättenschwiler y Vitousek, 2000).

Debido a la alta importancia de estos compuestos en la degradación del material, se decidió también identificarlos y observar las diferencias entre ambas especies. Para ello se utilizaron las técnicas de LC-MS y GC-MS, las cuales permiten, además de una separación de los compuestos presentes, la identificación de los mismos.

A partir de la técnica de GC-MS, fue posible identificar 14 compuestos fenólicos para la especie *Calophyllum brasiliense*. Estos fueron: ácidos cinámico, m-hidroxibenzoico, p-hidroxibenzoico, fenilacético, anísico, protocatéquico, siríngico, 2,3,4-trihidroxibenzoico, p-cumárico, benzoico, ferúlico, cafeico, catecol y catequina.

Asimismo, para el caso de *Bixa arborea*, fue posible la identificación de 6 compuestos fenólicos: Ácidos p-hidroxibenzoico, anísico, protocatéquico, p-cumárico, benzoico y cinámico.

Estos resultados son sumamente interesantes y dan un indicio de la actividad de estos compuestos en la degradación del material. Por ejemplo Kuiters (1990), investigó el efecto de polifenoles solubles como ácidos ferúlico, gálico y algunos flavonoides en los microorganismos del suelo. Se encontró que estos compuestos pueden inhibir la descomposición, dependiendo de la concentración y la temperatura, la germinación de esporas y el crecimiento de las hifas de hongos saprotróficos. Asimismo, el catecol y la catequina fueron estudiados por Butenschoen y col. (2009) y se reportó que tienen un efecto retardante sobre la acción de los descomponedores, especialmente sobre las lombrices de tierra.

Por otro lado, se compararon los resultados obtenidos por las técnicas de LC-MS y GC-MS para ambas especies de plantas. Mientras que para *Calophyllum brasiliense* se encontraron cinco compuestos (Los ácidos: gálico, cafeico, cumárico, ferúlico y cinámico). En *Bixa arborea* únicamente se pudo identificar el ácido cinámico. Es así que la técnica más adecuada, a pesar de necesitar una derivatización pre-columna, resultó la de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. No sólo es una técnica más sensible, pues se observaron más compuestos, sino que permite la identificación por medio de una base de datos que está incorporada al sistema, de manera que es más simple saber qué compuestos están presentes. Sería interesante,

más adelante, implementar una metodología para el análisis de polifenoles y taninos condensados en plantas, que permita una buena separación e identificación de todos los picos mediante la técnica de LC-MS.

Un punto que vale la pena resaltar es la correlación que se muestra en las tablas 8 y 9 de los compuestos fenólicos y taninos con los otros parámetros. Para el caso de *Calophyllum brasiliense* se observa que los compuestos fenólicos tienen una buena correlación con el contenido de carbono, nitrógeno y calcio. Esta relación se acentúa más para el caso de taninos condensados, en la que, además, se observa una interdependencia entre taninos y lignina y celulosa.

Estos resultados van de acuerdo a lo mencionado anteriormente y muestran un poco más el efecto de estos compuestos en otros parámetros, especialmente en nitrógeno y carbono.

En el caso de *Bixa arborea* es interesante comentar que se observó una correlación entre compuestos fenólicos y lignina, pero no con otros parámetros con los que se esperaba una relación como es el caso de nitrógeno.

4.4. Lignina

Otro de los componentes analizados fue la lignina. Este polímero tiene una estrecha relación con la degradación del material vegetal pues, como se mencionó anteriormente, es uno de los compuestos más recalcitrantes en las plantas y juega un papel importante en la descomposición. Diversas fuentes muestran que, a un mayor contenido de lignina inicial, el material vegetal tardará más tiempo en descomponerse (Berg y Maclaugherty, 2008; Rahman y col., 2013).

Para analizar lignina, inicialmente se planteó el método de floroglucinol – HCl y bromuro de acetilo que se basa en la tinción de la lignina con floroglucinol seguido de la solubilización de la lignina en bromuro de acetilo para luego medir la absorbancia, pero se tuvieron varios contratiempos.

Uno de los principales problemas que se encontró fue que se necesitaba de un estándar de lignina con el que trabajar en los métodos colorimétricos. Anteriormente ya se había extraído lignina de madera angiosperma para realizar los análisis pero, en vista de que los resultados eran diferentes a los reportados, se optó por trabajar con una matriz más parecida y por eso se siguió el método de Fukushima (2001) para obtener un estándar de lignina que funcione para el método de bromuro de acetilo. Se siguió el procedimiento paso a paso y se obtuvo un estándar que parecía que podía funcionar. Sin embargo, al ser la lignina un polímero complejo y heterogéneo, hasta el momento no se ha logrado una caracterización completa de la lignina, sólo algunos de sus fragmentos se han podido observar por técnicas como pirolisis, GC-TOF o RMN en fase sólida. Es por eso que se limitó a comparar el coeficiente de absorción molar obtenido con los reportados por Fukushima y comparar el espectro de absorción a 280 nm.

Con las muestras, sin embargo, se tuvieron más problemas. La intensidad de color obtenida por la tinción con floroglucinol no era la misma al pasar los días, a pesar de que se trataba de la misma muestra, como se puede observar en la tabla 4 de la sección 3.4.2. Asimismo, fue posible observar que no toda la lignina se disolvía en el bromuro de acetilo, de manera que, al hacer los triplicados, las desviaciones eran mayores también pues la concentración de lignina era diferente en cada tubo de reacción.

Se buscó en la literatura sobre posibles soluciones a este problema y se encontró que en algunos casos se adicionaba HClO_4 y calor para lograr una completa disolución de la muestra (Iiyama y Wallis, 2006; Fukushima y col., 2001), pero otras fuentes (Feng y col., 2007; Hatfield y col., 2005) mencionaban que adicionar ácido causaba una interferencia en la medición de contenido de lignina pues la hemicelulosa de las plantas se hidrolizaba y formaba productos que absorbían a la misma longitud de onda de trabajo, por lo que no se tomó en cuenta la recomendación de añadir ácido.

Se optó, entonces, por descartar el método colorimétrico y buscar otro que diera resultados más coherentes. Es por ello que se decidió trabajar con el método de Klason. Este se presentó como una buena alternativa ya que no precisaba de un

estándar, sino que las mediciones eran gravimétricas y, además, los posibles interferentes (proteínas, grasas, azúcares) podían ser eliminados rápidamente.

Analizando los resultados obtenidos para lignina Klason ($45,01 \pm 2,17\%$ para *Calophyllum brasiliense* y $39,84 \pm 2,02\%$ para *Bixa arborea*), se puede decir que se cumple la relación de que a mayor contenido de lignina, la degradación del material será más lenta. Esto se puede observar mejor en las tablas de correlación 8 y 9 en las que se puede ver la fuerte relación entre los contenidos de lignina de ambas especies y el porcentaje de peso perdido. No obstante, no se puede decir mucho más sobre su relación con la degradación del material pues este compuesto casi no desapareció en todo el tiempo en el que las hojas estuvieron en el suelo del bosque. Esto demuestra la alta renuencia del polímero a la descomposición. Asimismo, es posible hablar de una constante de degradación del material pre y post degradación de lignina, en este caso se analizó la constante pre-degradación pero, para futuras investigaciones, sería recomendable analizar este parámetro durante tiempos más extensos para ver mejor las variaciones y las correlaciones con las constantes de descomposición. De la misma forma, sería interesante analizar las variaciones del contenido de diferentes tipos de lignina (Klason, permanganato, bromuro de acetilo, entre otros.) a lo largo del tiempo de descomposición.

4.5. Celulosa y hemicelulosa

La celulosa y la hemicelulosa son dos polímeros sumamente importantes en las plantas. En general, un alto contenido de estos compuestos promueve la descomposición del material pues son una fuente de energía de calidad intermedia para los microorganismos.

Para determinar los niveles de celulosa y hemicelulosa se probaron, al igual que en el caso de lignina, dos métodos: uno colorimétrico (antrona) y otro gravimétrico (Van Soest). Por el método de antrona se encontró un contenido de celulosa de $10,61 \pm 0,84\%$ y $10,59 \pm 1,01\%$ para *Calophyllum* y *Bixa*, respectivamente. Por el método de Van Soest se reportó $25,22 \pm 1,22\%$ y $23,46 \pm 1,57\%$ para *Calophyllum* y *Bixa*, respectivamente. Asimismo, en el caso de hemicelulosa, se encontró un contenido de

10,45 ± 1,09% y 16,76 ± 1,44% por el método de antrona y, por el método de Van Soest, se reportó un contenido de 7,28 ± 1,40% y 11,38 ± 0,84%, para *Calophyllum* y *Bixa* en cada caso.

El método colorimétrico de antrona es ampliamente usado para el análisis de carbohidratos, sobre todo hexosas, por lo que significaba una buena alternativa para el análisis de estos polímeros que están compuestos por azúcares. Sin embargo, tanto para celulosa como hemicelulosa se puede observar que el valor reportado es menor para el ensayo de antrona con respecto al de Van Soest. Una posible explicación es que en el caso de hemicelulosa, no se estaba tomando en cuenta la presencia de azúcares pentosas y otros que la componen. Es por eso que, al comparar con el método de Van Soest, es posible observar que se reporta un menor contenido con respecto al gravimétrico. Asimismo, puede ser que esta diferencia entre los reportes por ambos métodos se deba a una pérdida de los azúcares por la presencia de ácido sulfúrico. Debido a que el método de antrona precisa que se hidrolice la celulosa y la hemicelulosa en azúcares más simples, se requiere de ácido en concentraciones elevadas, así como temperatura alta. Esto puede ocasionar también una hidrólisis de los azúcares, de manera que no reaccionan completamente con la antrona para dar el complejo de coloración azul que se requiere para la cuantificación. Es por ello que se continuó trabajando únicamente con el método de Van Soest.

Ahora bien, al observar ambas gráficas de la cinética de descomposición (figuras 26 y 27) es posible notar que hay un incremento en la concentración de los polímeros, seguido de una caída rápida. Esto sucede porque, inicialmente, los compuestos más lábiles, como fenólicos, taninos condensados, azúcares libres, proteínas, entre otros, son rápidamente degradados o filtrados hacia los suelos por acción de microorganismos o de lluvias, por ejemplo. Es así que la concentración neta de los polímeros aumenta en las primeras semanas. Sin embargo, una vez que estos compuestos son consumidos, la celulosa y hemicelulosa son atacadas para ser usadas como fuente de energía por los diversos organismos del suelo. Es así que la concentración de ambos polímeros empieza a decaer.

Un punto que vale la pena resaltar tiene que ver con las correlaciones de estos parámetros con la constante de descomposición y los otros marcadores. Para el caso de la especie *Calophyllum brasiliense*, se encontró que la celulosa tenía una correlación negativa con el peso perdido, el contenido de calcio y el porcentaje de lignina, y una correlación positiva con el contenido de carbono y nitrógeno. Sin embargo, para la hemicelulosa, no fue posible encontrar correlación alguna con los otros parámetros estudiados.

Por otro lado, el contenido de celulosa en *Bixa arborea* se pudo correlacionar negativamente con el porcentaje de peso perdido y la lignina, y positivamente con el contenido de carbono, nitrógeno, calcio y con hemicelulosa. La hemicelulosa presente en *Bixa* también se pudo correlacionar negativamente con el porcentaje de peso perdido y el contenido de lignina, y positivamente con los niveles de carbono, nitrógeno y calcio.

4.6. Macroelementos

La calidad del sustrato influye de manera notable en la descomposición del material vegetal. Diversas investigaciones (Goldman y col., 1987; Duarte y col., 1992) sostienen que la eficiencia del crecimiento microbiano en las plantas decrece hasta 100 veces al aumentar la relación C/N y C/P. Ambos son indicadores de la limitación de nitrógeno y fósforo en las plantas. Mientras mayor es esta relación, entonces la descomposición será más lenta puesto que los organismos descomponedores, al tener una menor cantidad de nutrientes disponibles, buscarán otras fuentes y por tanto la descomposición del material se verá retardada y viceversa.

El tejido vegetal en descomposición tiene diferentes cantidades de celulosa, hemicelulosa y lignina, todas importantes fuentes de carbono. Este elemento es el nutriente primario para los microorganismos del suelo, proveyéndoles energía para todos los procesos vitales. Cuando la hojarasca se va descomponiendo y se introduce a la superficie del suelo, los microorganismos empiezan el proceso de degradación usando el nitrógeno disponible para poder romper las moléculas de carbono, liberando CO_2 (g) y NH_4^+ como subproductos.

Como resultado de la respiración celular, el contenido de carbono en la hojarasca disminuye constantemente. Un factor importante que determina esta pérdida del C, aparte de la velocidad de producción de la fauna descomponedora, es la eficiencia de crecimiento de los microorganismos, es decir, cuánto del carbono asimilado es incorporado en nueva biomasa (proporción de producción-asimilación). Así como la velocidad de producción, la eficiencia de crecimiento depende de la calidad de la hojarasca y de los diferentes factores abióticos como la temperatura, disponibilidad de agua y nutrientes (Manzoni y col., 2010).

Por otro lado, la dinámica del nitrógeno puede o no seguir el mismo patrón que la dinámica de carbono. Existen diversas observaciones sobre el efecto del nitrógeno en la hojarasca, aunque son conflictivas (Hobbie, 2005; Knorr y col., 2005). Por ejemplo, estudios sobre la utilización de nitrógeno como fertilizante muestran que la adición de nitrógeno puede incrementar, disminuir o no tener efecto alguno sobre la velocidad de descomposición.

Usualmente, la hojarasca fresca contiene muy poca cantidad de nitrógeno disponible para los descomponedores. Para balancear esto, los microorganismos se encargan de captar nitrógeno inorgánico del suelo e inmovilizarlo en la hojarasca. Así, el contenido y la concentración de nitrógeno aumentan. Después de un tiempo, el nitrógeno de la hojarasca está en exceso, en comparación con las necesidades de los descomponedores, y en ese punto (proporción crítica C/N) se empieza a mineralizar el exceso. De esta manera, el nitrógeno sigue un patrón ascendente hasta llegar al punto crítico, cuando empieza a decaer.

Si, por el contrario, la relación C/N de la hojarasca fresco es igual o mayor al punto crítico, los organismos descomponedores comenzaran a mineralizar inmediatamente el nitrógeno excedente, de manera que se sigue un patrón descendente, muy parecido al del carbono.

En esta investigación fue posible observar que las tendencias de nitrógeno y carbono para ambas especies eran similares. Las figuras 18 y 19 muestran una disminución en

la concentración de estos elementos en el tiempo, lo que quiere decir que el contenido de nitrógeno inicial, así como la proporción C/N estaba sobre el límite crítico, lo que llevó a una mineralización de los nutrientes, aunque, en el caso de *Bixa arborea*, más que una mineralización neta se observa que el contenido de nitrógeno permanece casi constante hasta el día 210, a partir del cual hay una caída brusca que continúa hasta la última recolección del material.

Lo mismo sucede para el caso de los otros elementos estudiados, como calcio y fósforo. Estos elementos tienen diferentes patrones de liberación en el tiempo y, además, son retenidos por fuerzas, también diferentes en las estructuras de la hojarasca (Girisha y col., 2003). Los elementos que son escasos en una hojarasca en la que la proporción relativa al carbono (C/elemento) está por encima de los niveles críticos, serán retenidos, lo que resulta en una inmovilización de los mismos. Por otro lado, los elementos que están en exceso en la hojarasca donde la proporción C/elemento está por debajo del límite crítico serán liberados durante la descomposición.

En la descomposición, el contenido de fósforo puede aumentar o disminuir. El primero se atribuye a la inmovilización microbiana, mientras que el último se debe a la lixiviación del elemento por parte de las precipitaciones (Bockheim y col., 1991). En este trabajo, la concentración de fósforo en la hojarasca fue irregular, tanto en *Calophyllum brasiliense* como en *Bixa arborea* (figura 40). En el primer caso, el fósforo fue inmovilizado los primeros 14 días, y luego fue mineralizado hasta el día 210. Seguidamente, fue inmovilizado hasta el día 270 y liberado en los siguientes 30 días. Finalmente, el fósforo fue inmovilizado hasta el día 360.

Asimismo, se observa que para ambas especies, el calcio fue inmovilizado hasta los 90 días de descomposición, luego mineralizado hasta los 210 días, inmovilizado nuevamente hasta los 270 días, liberado al suelo hasta el día 300 y finalmente fijado a las hojas hasta el último muestreo (figura 39). Estos períodos de inmovilización ocurren, probablemente, debido a la captura de calcio por parte de las hifas fúngicas, según lo reportado por Swift y col. (1981).

Al igual que para los casos anteriores, se hicieron las correlaciones respectivas para ambas especies. Sólo para el caso de *Calophyllum brasiliense* se pudo encontrar una correlación entre el contenido de calcio y el porcentaje de peso perdido, así como con el contenido de carbono, nitrógeno y lignina, aunque no fue tan fuerte como en el caso de otros parámetros. El contenido de fósforo no se pudo relacionar con ningún parámetro en las dos especies.

4.7. Dinámica de degradación

A partir de todo lo descrito anteriormente, es posible decir que la química inicial de la hojarasca tiene una gran influencia sobre su descomposición y es posible utilizarla para dar predicciones sobre la velocidad de degradación del material. Así, al comparar ambas especies se observa que *Calophyllum brasiliense* presenta un mayor contenido de taninos condensados, polifenoles totales, mayores niveles de carbono y lignina, y un menor contenido de nitrógeno y hemicelulosa. *Bixa*, por otro lado, tiene un menor contenido de compuestos fenólicos, carbono y lignina, mayor contenido de nitrógeno, hemicelulosa, calcio y fósforo. Tan sólo con ver estos resultados, no es ilógico pensar que *Bixa* tendrá una descomposición más rápida que su par, y esto es exactamente lo que se observa al ver las gráficas de cinética.

Ahora, dentro de todos los parámetros que influyen en la descomposición, se puede decir que, en este caso, el contenido de taninos y polifenoles totales marca la diferencia en cuanto a especie se refiere. *Bixa arborea* tiene un contenido bastante bajo de taninos y polifenoles con respecto a *Calophyllum*, y esto es sumamente significativo en la estequiometría de los microorganismos encargados de la descomposición del material.

El contenido de nitrógeno y carbono, también influyen fuertemente en la descomposición, pues se cumple que la especie con mayor cantidad de nitrógeno disponible se descompone más rápido, pero los valores obtenidos para *Calophyllum* y *Bixa* son bastante cercanos, por lo que no puede hablarse de un parámetro determinante. Sin embargo, las proporciones C/N, C/P y lignina/N son significativamente diferentes, tanto al inicio como a lo largo de todo el tiempo de

descomposición y se relacionan fuertemente con la actividad microbiana, por lo que tienen un gran impacto en la degradación y podrían dirigir también este proceso.

Por otro lado, no se puede decir que la lignina tenga una gran influencia puesto que no se observa degradación de este compuesto en ninguna de las dos especies, por lo que no se puede medir el impacto real de este polímero en la descomposición del material. Tan solo se puede mencionar que la especie con un mayor contenido de lignina tarda más en degradarse que la otra especie, lo cual va de acuerdo con la literatura (Gallardo y Merino, 1999; Austin y Ballaré, 2010), que menciona que, a mayor contenido de lignina, la descomposición se verá retardada.

Asimismo, los valores de celulosa y hemicelulosa tienen un impacto menor pues desaparecen casi en la misma proporción para ambas especies.

El contenido inicial de calcio y fósforo también tiene un efecto secundario sobre la descomposición. Los microorganismos se encargan de inmovilizar o liberar estos elementos en el suelo, pero no se observa un patrón claro, por lo que no se puede determinar exactamente su influencia.

5. CONCLUSIONES

Los objetivos planteados en la sección 1.5 fueron cubiertos totalmente, a excepción del análisis de la relación de variables climáticas, como son temperatura y humedad, con la constante de descomposición de ambas especies. Es así que se analizaron los compuestos fenólicos totales, el contenido de taninos condensados, el nitrógeno, carbono, fósforo, calcio, los niveles de hemicelulosa, celulosa y lignina para ambas especies y se logró la caracterización de la dinámica microbiana de descomposición de la hojarasca.

Tanto carbono como nitrógeno y la proporción entre ambos (C/N), fueron buenos predictores de la velocidad de descomposición del material. Es así que, *Calophyllum brasiliense*, que tenía una mayor razón C/N, se descomponía con una velocidad menor a la de *Bixa arborea*.

Asimismo, se puede decir que los compuestos fenólicos totales, en especial los taninos condensados, contribuyen significativamente y son, quizá, el mejor predictor de velocidad de descomposición por lo descrito anteriormente en la sección de discusión de resultados. No sólo *Calophyllum* cuenta con un mayor contenido de estos compuestos, sino también con mayor variedad con respecto a *Bixa arborea*. Es así que estos compuestos rigen la descomposición no sólo al actuar como mecanismos de defensa, sino que influyen en el ciclo de nutrientes y afectan la composición y actividad de las comunidades de descomponedores.

En este caso, y según la literatura, el contenido de lignina inicial es un buen predictor de la descomposición del material. Se cumple que a mayor contenido de lignina, la descomposición será más lenta. Sin embargo, debido a que, hasta la última recolección de material, la lignina en la hojarasca aún no se había degradado, no se puede decir, con seguridad, si es cierto que la especie de *Calophyllum brasiliense*, por tener mayores niveles de lignina, se degradará más lento que *Bixa arborea*. Este hecho también indica la posibilidad de que existan varias etapas de degradación del material. La primera llevada por el contenido de compuestos fenólicos y macroelementos, y la otra regida por la degradación de la lignina. Es por eso que, para futuras investigaciones, se recomienda dejar el material en la superficie del suelo del bosque

hasta que la degradación sea completa o, al menos, hasta que se vea un cambio significativo en los niveles de lignina.

Celulosa y hemicelulosa no son tan determinantes en relación a la velocidad de descomposición, aunque sí son parámetros importantes a tener en cuenta pues son fuente de energía primaria para los microorganismos descomponedores.

Para el caso de calcio y fósforo, no se pudo encontrar una correlación tan estrecha como con los otros parámetros estudiados, pero son parámetros interesantes pues muestran la actividad de los microorganismos del suelo sobre la hojarasca, ya que adecuan los niveles de estos elementos en la planta de acuerdo a su propia estequiometría.

Para futuros análisis se recomienda instalar un sensor de temperatura y humedad para poder correlacionar estos parámetros con la velocidad de degradación. También, trabajar con un material de bolsas más resistente para evitar pérdidas del material y/o contaminación con el suelo del bosque. De la misma forma, es necesario implementar nuevas técnicas de determinación de lignina pues las actuales no son completamente confiables y no permiten una caracterización de la lignina presente.

Finalmente, sería interesante ahondar más en la caracterización de polifenoles totales y taninos condensados presentes en diversas especies de plantas y su actividad en la descomposición de la hojarasca de las mismas.

6. BIBLIOGRAFÍA

- Achard, F. (2002). Determination of deforestation rates of the World's Humid Tropical Forests. *Science*: 9, 999-1002
- Austin, A., Ballaré, C. (2010). Dual role of lignin in plant litter decomposition in terrestrial ecosystems. *Proceedings of the National Academy of Sciences*: 107, 4618-4622
- Aerts, R. (1997). Climate, leaf litter chemistry and leaf litter decomposition in terrestrial ecosystems: a triangular relationship. *Oikos*: 79, 439-449.
- Bajwa, D. (1985). The biology of mycorrhiza in the Ericaceae IX. Peptides as nitrogen sources for the ericoid endophyte and for mycorrhizal and non-mycorrhizal plants. *New Phytologist*: 101, 459-467
- Bernhardt, (2012). The Nitrogen Cycle: Processes, Players, and Human Impact. *Nature Education Knowledge*: 3, 25.
- Berg, B., McClaugherty, C. (2008). Plant litter. Springer, Heidelberg.
- Boerjan, W., Ralph, J., Baucher, M. (2003). Lignin biosynthesis. *Annual Review of Plant Biology*: 54, 519-546.
- Brinson, M. (1977). Decomposition and Nutrient Exchange of Litter in an Alluvial Swamp Forest. *Ecology*: 58, 601-609
- Bockheim, J.G., Jepsen, E.A., Heisey, D.M. (1991). Nutrient dynamics in decomposing leaf litter of four tree species on a sandy soil in north-western Wisconsin. *Canadian Journal of Forest Research*: 21, 803-812
- Bucholtz, D., Cantrell, R., Axtell, J., Lechtenberg, V. (1980). Lignin Biochemistry of normal and brown midrib mutant sorghum. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 28, 1239-1241.
- Butenschoen, O., Ji, R., Schaeffer, A., Scheu, S. (2009). The fate of catechol in soil as affected by earthworms and clay. *Soil Biology & Biochemistry*: 41, 330-339.
- Castellanos, B., León, J. (2011). Descomposición de hojarasca y liberación de nutrientes en plantaciones de *Acacia mangium* (Mimosaceae) establecidas en suelos degradados de Colombia. *Revista de Biología Tropical*: 59, 113-128.
- Crang, R., Holsen, R., Hitt, J. (1968). Calcite production in mitochondria of earthworm calciferous glands. *BioScience*: 18(4), 299-301.
- DeBusk, W., Reddy, K. (2005). Litter decomposition and nutrient dynamics in a phosphorus enriched Everglades Marsh. *Biogeochemistry*. 75, 217-240.
- Denman, K.L., Brasseur, G., Chidthaisong, A., Giais, P., Cox, P.M., Dickinson, R.E.,

Hauglustaine, D., Heinze, C., Holland, E., Jacob, D., Lohmann, U., Ramachandran, S., da Silva Dias, P.L., Wofsy, S.C., Zhang, X. (2007). Couplings between changes in the climate system and biogeochemistry. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press, Nueva York.

Duarte, C. (1992). Nutrient concentration of aquatic plants: Patterns across species. *Limnology and Oceanography*: 37, 882–889.

Feng, X., Simpson, M. (2007). The distribution and degradation of biomarkers in Alberta grassland soil profiles. *Organic Geochemistry*: 38, 1558–1570.

Fukushima, R., Hatfield, R. (2001). Extraction and isolation of lignin for utilization as a standard to determine lignin concentration using the acetyl bromide spectrophotometric method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 49, 3133-3139

Fukushima, R., Hatfield, R. (2004). Comparison of the acetyl bromide spectrophotometric method with other analytical lignin methods for determining lignin concentration in forage samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 52, 3713-3720.

Garcia, S., Latgé, J. (1987). A new colorimetric method for dosage of lignin. *Biotechnology Techniques*: 1, 63-68.

Gallardo, A., Merino, J. (1999). Leaf Decomposition in Two Mediterranean Ecosystems of Southwest Spain: Influence of Substrate Quality. *Ecology*: 74, 152–161

Girisha, G., Condrón, L., Clinton, P., Davis, M. (2003). Decomposition and nutrient dynamics of green and freshly fallen radiate pine (*Pinus radiata*) needles. *Forest Ecology and management*: 179, 169–181.

Goldman, J., Caron, D., Dennett, M. (1987). Regulation of gross growth efficiency and ammonium regeneration in bacteria by substrate C:N ratio. *Limnology and Oceanography*: 32, 1239–1252.

Gonzalez, G., T.R. Seastedt. (2001). Soil fauna and plant litter decomposition in tropical and subalpine forests. *Ecology*: 82, 955-964.

Goya, J., Frangi, J., Pérez, C., Dalla, F. (2008). Decomposition and nutrient release from leaf litter in *Eucalyptus grandis* plantations on three different soils in Entre Ríos, Argentina. *Bosque*: 29, 217-226.

Gullison, R. (2007). Tropical forests and climate policy. *Science*: 316, 985-986.

Guo, L.B., Gifford, R.M. (2002). Soil carbon stocks and land use change. *Global Change Biology*: 8, 345–360.

Haase, K., Wantzen, K. (2008). Analysis and decomposition of condensed tannins in tree leaves. *Environmental Chemistry Letters*: 6, 71-75.

Harmon M., Lajtha, K. (1999). Analysis of detritus and organic horizons for mineral and organic constituents. En: Standard soil methods for long-term ecological research. Oxford University Press, Nueva York

Hättenschwiler, S., Coq, S., Barantal, S., Handa, I. (2011). Leaf traits and decomposition in tropical rainforests: revisiting some commonly held views and towards a new hypothesis. *New Phytologist*: 189, 950–965

Hättenschwiler, S., Vitousek, P. (2000). The role of polyphenols in terrestrial ecosystem nutrient cycling. *Trends in Ecology and Evolution*: 15(6), 238-243.

Häkkinen S. (2000). Flavonols and phenolic acids in berries and berry products – Tesis doctoral. Kuopio University Publications, Finlandia.

Hatfield, R. (1994). A comparison of the insoluble residues produced by the Klason lignin and acid detergent lignin procedures. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 65, 51-58

Hatfield, R., Fukushima, R. (2005). Can Lignin be Accurately Measured? *Crop Science* 45, 832-839.

Hobbie, E. (2005). Using isotopic tracers to follow carbon and nitrogen cycling of fungi. Dighton, J.; White, J.; Oudemans, P. (eds). En: The fungal community: its organization and role in the ecosystem. 361-318.

Knorr, M., Frey, S., Curtis, P. (2005). Nitrogen additions and litter decomposition: A meta-analysis. *Ecology* 86, 3252–3257

Kuiters, A. (1990). Role of phenolic substances from decomposing forest litter in plant-soil interactions. *Acta Botanica Neerlandica*: 39, 329–348

Ibáñez, L. (2007). Efecto antitumoral, anti VIH y elucidación estructural de las hojas y corteza de *Calophyllum brasiliense* de Satipo y Pucallpa. *Revista de la Academia Peruana de Salud* 14, 90-96.

Iiyama, K., Wallis, A. (2006). Determination of lignin in herbaceous plants by an improved acetyl bromide procedure. *Journal of the Science of Food and Agriculture*: 51, 145-161.

Ingham, E. (2000). The soil food web. En: Soil Biology Primer. Soil and Water Conservation Society, Iowa.

Intergovernmental panel on climate change: IPCC. (2007). The Physical Science Basis: Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Versión digital disponible en: <http://www.slvwd.com/agendas/Full/2007/06-07-07/Item%2010b.pdf>.

Ise, T., Moorcroft, P. (2006). The global-scale temperature and moisture dependencies of soil organic carbon decomposition: an analysis using a mechanistic decomposition model. *Biogeochemistry*: 80, 241-261.

- Kähkönen, M., Hopia, A., Vuorela, H., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T., Heinonen, M. (1999). Antioxidant Activity of Plant Extracts Containing Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 47, 3954-3962
- Kauffman, J., Hughes, F., Heider, C. (2009). Carbon pool and biomass dynamics associated with deforestation, land use, and agricultural abandonment in the neotropics. *Ecological Applications*: 19, 1211–1222
- Kursar, T., Coley, P. (2003). Convergence in defense syndromes of young leaves in tropical rainforest. *Biochemical Systematics and Ecology*: 31, 929-949
- Lal, R. (2005). Forest soil and carbon sequestration. *Forest Ecology and Management*. 220, 242-258.
- Lattanzio, V. (2006). Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. En: *Phytochemistry: Advances in Research*, 23-67
- Lavelle, P., Spain, A. (2001). *Soil ecology*. Kluwer Scientific Publications, Dordrecht, Amsterdam. pp. 211-239.
- Manzoni, S., Trofymow, J., Jackson, R., Porporato, A. (2010). Stoichiometric controls on carbon, nitrogen, and phosphorus dynamics in decomposing litter. *Ecological Monographs* 80, 89-106.
- Mayaux, P. (2005). Tropical forests cover change in the 1990s and options for future monitoring. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London: Biological Sciences*: 28, 373-84.
- Olson, J. (1963). Energy storage and the balance of producers and decomposers in ecological systems. *Ecology*: 44, 322-331.
- Palm, C.A., Sanchez, P.A. (1990). Decomposition and Nutrient Release Patterns of the Leaves of Three Tropical Legumes. *Biotropica*: 22, 330-338.
- Paul, K. (2001). Temperature and moisture effects on decomposition. CRC for Greenhouse accounting, Canberra.
- Price, M., Van Scoyoc, S., Butler, L. (1978). A Critical Evaluation of the Vanillin Reaction as an Essay for Tannin in Sorghum Grain. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 26, 1214-1218.
- Poppendieck, H. (2001). Bixaceae. En: Stevens, W., Ulloa, C., Pool, A., Montiel, O (eds.). *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden*, 85(1): 428–430
- Rahman, M.M, Rahman, M.A. (2012). Quantitative Chemical Defense Traits, Litter Decomposition and Forest Ecosystem Functioning, Forest Ecosystems - More than Just Trees. Juan A. Blanco (Ed.), Edmonton.

- Rahman, M.M, Tsukamoto, J., Yoneyama, A., Mohammad, K. **(2013)**. Lignin and its effects on litter decomposition in forest ecosystems. *Chemistry and Ecology*: 29, 540 – 553.
- RAINFOR. **(2010)**. Amazon Forest Inventory Network- Rainfor Project annual report.
- Reich, P., Oleksyn, J., Modrzyński, J., Mrozinski, P., Hobbie, S., Eissenstat, D., Chorover, J., Chadwick, O., Hale, C., Tjoelker, M. **(2005)**. Linking litter calcium, earthworms and soil properties: a common garden test with 14 tree species. *Ecology Letters*: 8, 811-818
- Reidinger, S., Ramsay, M., Hartley, S. **(2012)**. Rapid and accurate analyses of silicon and phosphorus in plants using a portable X-ray fluorescence spectrometer. *New Phytologist*: 195(3), 699-706.
- Robertson G., Paul, E. **(1999)** Decomposition and soil organic matter dynamics. En: *Methods of ecosystem science*. SpringerVerlag, Nueva York.
- Ruiz-Dueñas, F., Martínez, A. **(2009)**. Microbial degradation of lignin: how a bulky recalcitrant polymer is efficiently recycled in nature and how we can take advantage of this. *Microbial Biotechnology*: 2, 164–177.
- Salinas, N., Malhi, Y., Meier, P., Silman, M., Roman Cuesta, M., Huaman, J., Salinas, D., Huaman, V., Gibaja, A., Mamani, M., Farfan, F. **(2011)**. The sensitivity of tropical leaf litter decomposition to temperature: results from a large-scale leaf translocation experiment along an elevation gradient in Peruvian forests. *New Phytologist*: 189, 967-977.
- Schädel, C., Blöchl, A., Richter, A., and Hoch, G. **(2009)**. Short-term dynamics of non-structural carbohydrates and hemicelluloses in young branches of temperate forest trees during bud break, *Tree Physiology*: 29, 901–911
- Schlesinger, W. H. **(1991)**. *Biogeochemistry: an analysis of global change*. Academic Press, New York.
- Schlesinger, W.H., Andrews J.A. **(2000)**. Soil respiration and the global carbon cycle. *Biogeochemistry*: 48, 7-20.
- Stockmann, U., Adams, M., Crawford, J., Field, D., Henakaarchchi, N., Jenkins, M., Minasny, B., McBratney, A., Courcelles, V., Singh, K., Wheeler, I., Abbott, L., Angers, D., Baldock, J., Birde, M., Brookes, P., Chenu, C., Jastrow, J., Lal, R., Lehmann, J., O'Donnell, A., Parton, W., Whitehead, D., Zimmermann, M. **(2013)**. The knowns, known unknowns and unknowns of sequestration of soil organic carbon. *Agriculture, Ecosystems and Environment*: 164, 80-89.
- Sun, B., Ricardo-da-Silva, J., Spranger, I. **(1998)**. Critical factors of vanillin assay for catechins and proanthocyanidins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*: 46, 4267-4274.

Suzuki, Y., Tsujimoto, Y., Matsui, H. (2006). Decomposition of extremely hard-to-degrade animal proteins by thermophilic bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*: 10, 73-81

Swift, M., Russel-Smith, A., Perfect, T. (1981). Decomposition and mineral-nutrient dynamics of plant litter in a regenerating bush-fallow in sub-humid tropical Nigeria. *Journal of Ecology*: 69, 981–995.

Thomas, S. C., Baltzer, J. L. (2002). Tropical Forests. Encyclopedia of Life Sciences. MacMillan Reference Limited, Londres.

TROPICOS (2015) Disponible en: www.tropicos.org

Uppdegraff, C. (1969). Semimicro determination of cellulose in biological materials. *Analytical Biochemistry*. 32, 420-424.

Vanholme, R., Demedts, B., Morreel, K., Ralph, J., Boerjan, W. (2010). Lignin Biosynthesis and Structure. *Plant Physiology*: 153, 895–905

Van Meeteren M., Tietema, A., Westerveld, J. (2007). Regulation of microbial carbon, nitrogen and phosphorus transformations by temperature and moisture during decomposition of *Calluna vulgaris* litter. *Biology and Fertility of Soils*: 44, 103-112.

Van Soest, P.J., Robertson, J.B. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fibre and non-starch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*: 74, 3583 - 3597

Vermerris, W., Nicholson, R. (2008). Phenolic compound Biochemistry. Springer Science, Florida, pp. 276

Wall, D.H., Bradford, M.A., White, D., Zou, X.M. (2008). Global decomposition experiment shows soil animal impacts on decomposition are climate-dependent. *Global Change Biology*: 14, 2661-2677.

Waterman, P., Mole, S. (1994). Analysis of Phenolic plant metabolites. Ecological Methods and concepts. Blackwell Scientific Publications, Oxford.

Westermarck, U. (1982). Calcium promoted phenolic coupling by superoxide radical: A possible lignification reaction in wood. *Wood Science and Technology*: 16, 71–78.

Xiao, Y. (2000). Modelling temperature-dependency in biology by generalizing temperature coefficient Q10. *Ecological Modelling*: 127, 283-290

Zech W., Senesi, N., Guggenberger, G., Kaiser, K., Lehmann, J., Miano, T., Miltner, A., Schroth G. (1997). Factors controlling humification and mineralization of soil organic matter in the tropics. *Geoderma*: 79, 117–161