



INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA.

**“ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS
FÚLVICOS Y SU INTERACCIÓN CON ALGUNOS
METALES PESADOS”.**

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADA EN QUÍMICA

PRESENTA:

LETICIA MELO LÓPEZ.

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. DE LOURDES PACHECO
HERNÁNDEZ.**

PACHUCA DE SOTO, HIDALGO

MAYO DE 2006

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Ma de Lourdes Pacheco Henández por el apoyo que me brindo, por la oportunidad que me dio de trabajar y aprender mucho con ella; así como por el trato tan afectuoso que tuvo siempre conmigo durante todo este tiempo.

A la Dra. Ma. Elena Páez por su paciencia, buena carácter, voluntad y tiempo empleado para ayudarme a culminar este trabajo.

A mis amigas Karemi, Marlen y esepciamente a Cris por brindarme su amistad, estar conmigo y ayudarme cuando lo necesité.

A mis padres Altagracia López Escorcía y Armando Melo Santos por confiar y creer siempre en mí. Por la paciencia que me han tenido y por apoyarme económicamente durante todo este tiempo, a pesar de mis intentos fallidos, ya que sin ellos no hubiera logrado superarme.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	iii
ÍNDICE DE TABLAS	ix
NOTACIONES Y UNIDADES	x
INTRODUCCIÓN	1
1. ANTECEDENTES	4
1.1 Sustancias húmicas: Ácidos Fúlvicos	5
1.2 Formación, composición y estructura de los Ácidos Fúlvicos	7
1.3 Propiedades y aplicaciones de los Ácidos Fúlvicos	10
1.4 Procesos de extracción y purificación de los Ácidos Fúlvicos	13
1.5 Técnicas experimentales utilizadas para el estudio de los Ácidos Fúlvicos	17
1.6 Estudios de la interacción Ácidos Fúlvicos-metal	20
2. OBJETIVOS	23
2.1 Objetivo general	24
2.2 Objetivos específicos	24
3. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÀCIDOS FÚLVICOS	25
3.1 Equipo y reactivos	26
3.2 Extracción de los Ácidos Fúlvicos	26
3.2.1 Ácidos Fúlvicos en estudio	26
3.2.2 Toma de muestra de suelos	27
3.2.3 Preparación de la muestra para la extracción	28
3.2.4 Extracción y purificación de los Ácidos Fúlvicos	28
3.2.5 Preparación de soluciones acuosas de Ácidos Fúlvicos	31
3.3 Caracterización de los Ácidos Fúlvicos	31
3.3.1 Análisis elemental	31
3.3.2 Contenido de cenizas	32
3.3.3 Espectroscopía Ultravioleta/Visible	32
3.3.4 Espectroscopía de infrarrojo	32
3.4 Resultados y discusión	33
3.4.1 Análisis elemental	33
3.4.2 Contenido de cenizas	35
3.4.3 Espectroscopía Ultravioleta/Visible	35
3.4.4 Espectroscopía de infrarrojo	37
4. ESTUDIO POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE LA INTERACCIÓN ACIDOS FULVICOS-METAL	41
4.1 Seguimiento de la señal de los Ácidos Fúlvicos y su alteración debido a la adición de metal	42
4.1.1 Selección de condiciones para la separación de Ácidos Fúlvicos por Electroforesis Capilar	43
4.1.1.1 Concentración de la muestra	43

4.1.1.2	Concentración del buffer	44
4.1.1.3	Voltaje de separación	46
4.1.1.4	Temperatura de separación	47
4.1.1.5	Polaridad	48
4.1.1.6	Inyección de la muestra	49
4.1.1.7	Señal correspondiente al buffer	50
4.1.1.8	Efecto de la naturaleza del buffer en la resolución	51
4.1.1.9	Estudio de la estabilización de los Ácidos Fúlvicos	54
4.1.1.9.1	Estudio de la estabilización por medios físicos y químicos	54
4.1.1.9.2	Estudio de la estabilización por incorporación de aditivos	56
4.1.2	Estudio de la interacción Ácidos Fúlvicos – metal	60
4.1.2.1	Procedimiento	61
4.1.2.2	Resultados y discusión	62
4.2	Seguimiento de la señal del metal y su alteración debido a la adición de Ácidos Fúlvicos	65
4.2.1	Método para el seguimiento de metales	65
4.2.1.1	Elección del buffer para los experimentos por Electroforesis Capilar	65
4.2.2	Estudio de la interacción del Ácidos Fúlvicos-metal	66
4.2.2.1	Procedimiento	67
4.2.2.2	Resultados y discusión	68
5.	ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE DE LA INTERACCIÓN ACIDOS FULVICOS - METAL	72
5.1	Equipo y condiciones de estudio	73
5.1.1	Estimación de las constantes de complejación con el programa computacional SQUAD	74
5.2	Resultados y discusión	76
6.	CONCLUSIONES	78
7.	REFERENCIAS	82

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Teoría de la formación de SH a partir de la lignina según Waksman [2].	7
2. Rutas de formación de <i>humus</i> propuestas por Stevenson basadas en la formación de quinonas [2].	8
3. Ruta de la formación de <i>humus</i> propuesta por Stevenson basada en la condensación de aminocompuestos a partir de azúcares [2].	9
4. Estructuras hipotéticas de AF, propuestas por Schnitzer y Khan (a), Bergmann (b), Buffle (c), Manahan (d) y Bersbo (e).	11
5. Proceso de separación de los AF, AH y huminas con base a sus solubilidades en medios alcalinos y/o ácidos.	13
6. Diagrama descriptivo de los pasos a seguir para extraer y aislar AF mediante el método IHSS.	17
7. Ejemplos de electroferogramas de AF reportados en la literatura. (a) Diferentes AF 0.15 mg mL^{-1} disueltos en urea 5 M; buffer de fosfatos 40 mM pH = 6.8; capilar de sílice cubierto de PVA; 10 kV; $L_t = 64.5 \text{ cm}$; $L_d = 56 \text{ cm}$; d. i. = $100 \text{ }\mu\text{m}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$ [46]; (b) AF estándar Suwannee River disuelto en NaOH, d. i. = $75 \text{ }\mu\text{m}$, $L_t = 50 \text{ cm}$; buffer de KH_2PO (3 mM) - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (6 mM) con pH 8.9; $T = 30^\circ \text{ C}$; 30 kV; $\lambda = 214 \text{ nm}$ [47]; (c) AF Bouzule Pseudogley soil disuelto en SDS 100 mM; buffer de carbonatos (25 mM) - SDS (100 mM) pH = 9.2; $L_t = 57 \text{ cm}$; $L_d = 50 \text{ cm}$; $\lambda = 325 \text{ nm}$ [44]; (d) Electroferograma de AF en tres dimensiones; buffer de acetatos 50 mM pH = 5.0; 25 kV; 30° C ; $L_t = 100 \text{ cm}$; d. i. = $50 \text{ }\mu\text{m}$ [40].	20
8. Toma de muestra de suelo por medio de pala.	28
9. Espectro de UV/Vis de una solución acuosa del AF estándar Elliott Soil $1 \times 10^{-7} \text{ M}$.	36
10. Espectros de infrarrojo de los AF analizados obtenidos en pastilla de KBr. (a) AF estándar Pahokee Peat, (b) AF estándar Elliott Soil y (c) AF extraídos de Tulancingo.	39

11. Estudio electroforético de la variación de la concentración de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil, buffer de ácido bórico 90 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM a pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 44
12. . Estudio electroforético de la variación de la concentración del buffer y su efecto en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. Composición del buffer A-D en la tabla 5. FEO = Flujo electroosmótico. 45
13. Estudio electroforético del efecto de la variación del voltaje en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20° C, $\lambda = 214$ nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 46
14. Efecto de la temperatura en la separación electroforética de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, voltaje de separación 20 kV, $\lambda = 214$ nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 48
15. Efecto del sentido de la polaridad en la separación electroforética de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida. FEO = Flujo electroosmótico. 49
16. Estudio electroforético del efecto de la variación en la inyección de la muestra en la separación de AF. Condiciones: 50

- AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128 ; 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.
17. Comparación de las señales producidas por el buffer de corrida y el AF en estudio. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128 ; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 51
 18. Estudio electroforético de la variación de la composición del buffer de corrida y su efecto en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida. (a) polaridad normal y (b) polaridad reversa. 52
 19. Electroferogramas de AF obtenidos (a) en un mismo día y (b) en días diferentes. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 53
 20. Efecto de la adición de azida en la estabilización de AF. (a) Electroferogramas generados por la solución de AF-NaN₃, AF y NaN₃. (b) Separación de los AF 0.5 mM / NaN₃ 1.5 mM el día en que fue preparada la solución y 3 días después. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM con NaN₃, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 55
 21. Electroferograma de AF sometido a diversos tratamientos 56

físicos. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal, inyección de la muestra de forma hidrodinámica a 2 psi durante 4 segundos.

22. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con SDS. (A) AF disueltos en buffer, (B) AF disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + SDS 10 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 57
23. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con CTAB. (A) AF estándar disueltos en buffer, (B) AF estándar disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + CTAB 1.3 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 58
24. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con TWEEN. (A) AF estándar disueltos en buffer, (B) AF estándar disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + TWEEN 0.24 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 59
25. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con β -CDs. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / 60

EDTA 0.75 mM + β -CDs 10 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal.

26. Descripción gráfica del procedimiento para el seguimiento por EC de la variación de la señal de los AF por la adición de metal. 61
27. Estudio electroforético de la interacción del AF estándar Elliott Soil con diversos iones metálicos. (a) AF-Cu²⁺, (b) AF-Cd²⁺, (c) AF-Pb²⁺, (d) AF-Hg²⁺ y (e) AF-Co²⁺. Condiciones: Buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 63
28. Estudio electroforético de la interacción del AF de Tulancingo con diversos iones metálicos. (a) AF-Cu²⁺, (b) AF-Cd²⁺, (c) AF-Pb²⁺, (d) AF-Hg²⁺ y (e) AF-Co²⁺. Condiciones: Buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico. 64
29. DDE's para los diferentes sistemas M²⁺/acetatos/agua. (a) Cu²⁺, (b) Pb²⁺ y (c) Hg²⁺. Con buffer de acetatos 50 mM. 66
30. Descripción gráfica del procedimiento para el seguimiento por EC de la variación de la señal del metal por la adición de AF. 67
31. Estudio electroforético de la interacción Ion metálico-AF estándar Elliott Soil. (a) Hg²⁺-AF, (b) Pb²⁺-AF y (c) Cu²⁺-AF. Condiciones: Buffer de acetatos 50 mM a pH = 3.5, inyección hidrodinámica de la muestra (M²⁺) 5 seg, presión 0.3 psi, 25° C, voltaje de separación 20 kV ; λ = 214 nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal. 69
32. Variación de la altura de pico con respecto a la concentración del metal en los estudios electroforéticos de la interacción ión metálico-AF. 70

33. Esquema del procedimiento experimental de las valoraciones espectrofotométricas. 74
34. Espectro de absorción para la valoración de Pb^{2+} 5×10^{-5} M con AF estandar Elliott Soil 0.001 M. 76

ÍNDICE DE TABLAS

1. Extractantes de SH comúnmente utilizados.	14
2. Análisis elemental y porcentaje de cenizas obtenidos de los AF estándar y de los AF extraídos de un suelo hidalguense (*%O calculado como la diferencia del 100%).	33
3. Valores de los cocientes E_4/E_6 para los diferentes AF en estudio.	37
4. Asignación de las bandas de absorción de los espectros de infrarrojo de la Figura 10 (a).	40
5. Concentración de los componentes del buffer ácido bórico / TRIS / EDTA utilizados para generar los electroferogramas mostrados en la Figura 12.	45
6. Variación de las concentraciones de M^{2+} y de los AF durante el seguimiento de la señal de los AF estándar Elliot Soil.	61
7. Valores de las constantes de equilibrio AF – Metal.	77

NOTACIONES Y UNIDADES

AF	Ácidos fúlvicos
AH	Ácidos húmicos
CEPAR	Cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución
CET	Cromatografía de exclusión por tamaño
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetros
CTAB	Bromuro de trimetil cetil amonio
d. i.	Diámetro interno
EC	Electroforesis capilar
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMDRICTF	Espectrometría de masas con detección de resonancia de iones con ciclotron y transformada de Fourier
EMIDLTF	Espectrometría de masas de ionización por desorción de láser y transformada de Fourier
EMIE	Espectrometría de masas de ionización por electrospray
ESI's	Electrodos selectivos de iones
FCF	Fraccionamiento campo-flujo
FEO	Flujo electroosmótico
g	Gramo
h	Hora
IHSS	Asociación Internacional de Sustancias Húmicas
kg	Kilogramo
kV	Kilovolt
L_d	Longitud del capilar al detector
L_t	Longitud total del capilar
M	Molar
$M\Omega$	Miliohms
M^{2+}	Ión metálico con estado de oxidación 2+
MES	Ácido 2-(N-morfolino)etanosulfónico
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
mUA	Miliunidades de absorbancia
nm	Nanómetros
°C	Grados centígrados
psi	(Pounds per square inch) Libra sobre pulgada al cuadrado
PVA	Alcohol polivinílico
RMN	Resonancia magnética nuclear
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundos
SH	Sustancias húmicas
T	Temperatura
t	Tiempo
TRIS	Tris(hidroximetil)metilamina
TWEEN	Polietilen sorbitan
UV/Vis	Ultravioleta/visible
V	Voltaje
β -CD's	Beta-ciclodextrinas
δ	Tijereo
λ	Longitud de onda
μ m	Micrómetro
v	Estiramiento
ρ	Sacudido

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

Los ácidos fúlvicos (AF) son sustancias químicas naturales polifuncionales muy complejas, que forman parte de las sustancias húmicas (SH), las cuales están presentes en suelos, lagos y mares, y que además son la base de los ciclos de los micronutrientes del suelo. Los AF son agentes complejantes de cationes metálicos muy importantes, por lo que causan un impacto directo en la biodisponibilidad y transporte de los mismos.

En general, las SH son un campo de estudio que tiene mucho tramo por recorrer, ya que no se conoce mucho acerca de ellas a pesar de su importancia. Es por ello que cualquier aportación sería en este campo es relevante para su mejor entendimiento, ya que ayudará a discernir la forma en que estas sustancias actúan en el medio ambiente y en los ecosistemas en que se encuentren.

En este trabajo se analizaron y caracterizaron AF de diferente fuente (turba y suelo) y origen (Estados Unidos y México), para posteriormente estudiar su interacción con algunos metales, y así relacionar su comportamiento complejante con los grupos funcionales que se cree contienen. Así, en el capítulo 1 se exponen las características de los AF, las teorías existentes sobre su formación, las propiedades y aplicaciones (en su mayoría médicas), los procesos de extracción más comúnmente conocidos, así como los más recomendables. También se mencionan las técnicas utilizadas hasta la fecha para el estudio de los AF. En el capítulo 2 se presentan los objetivos generales y específicos; en el capítulo 3 se detalla la parte experimental donde se explican los procedimientos llevados a cabo desde la toma de muestra de suelo, pasando por el tratamiento y la extracción de los AF; también se presenta la caracterización de los AF mediante diversas técnicas analíticas, como son análisis elemental, contenido de cenizas, espectroscopias UV/Vis e infrarrojo. Más adelante (capítulo 4) se muestra el estudio de la complejación de los AF con metales por medio de electroforesis capilar (EC), desde conocer las mejores condiciones a utilizar para tener el mejor método electroforético hasta la obtención de diversas familias de

electroferogramas que muestran los cambios que van sufriendo las señales tanto de AF como de los metales durante su complejación.

En el capítulo 5 se muestran los espectros UV/Vis resultantes de la valoración de metales con AF, a partir de los cuales se obtienen datos que son útiles para el cálculo de constantes relativas de complejación AF-metal con la ayuda del programa computacional SQUAD, el cual proporcionó información acerca de la fuerza con la que interactúan los AF con los iones metálicos (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}).

En el capítulo 6 se presentan las conclusiones concernientes a la experimentación realizada y para finalizar, en el capítulo 7, se listan las referencias consultadas durante la realización de este trabajo de investigación.

1. ANTECEDENTES

1. ANTECEDENTES

1.1 Sustancias húmicas: Ácidos Fúlvicos

Las propiedades de los suelos son consecuencia de sus características físicas y químicas, y por tanto, del tipo de gránulos que lo conforman, los cuales se clasifican según su tamaño y composición. Los gránulos que exceden los 2 mm reciben el nombre de grava, y no se consideran en los análisis químicos de los suelos; en cambio, los gránulos de menor tamaño se dividen en tres clases según su “diámetro medio”. Las partículas cuyo diámetro medio está comprendido entre 2.0 mm y 200 μm se llaman *arena*; las de diámetro medio de 200 μm a 2 μm se llaman *limo*, y aquellas cuyo diámetro medio es igual o inferior a 2 μm forman la *arcilla*. La arcilla está conformada por partículas tanto de naturaleza química inorgánica (p. ej. hidróxidos de hierro y aluminio) como de sustancias orgánicas que comúnmente llamamos *humus*.

A la fecha se utiliza el término *humus* cuando se desea hablar de la materia orgánica que ha perdido todo vestigio de organización biológica (celular) y que vista al microscopio aparece como una materia amorfa, compleja, macromolecular y polimérica [1]. El *humus* posee inusuales y excepcionales habilidades de cambio, alteración y combinación molecular, ya que son capaces de interactuar a nivel molecular con otras sustancias orgánicas e incluso inorgánicas. La palabra “*humus*” no siempre se ha utilizado de la misma forma; pues fue en Roma (1761) donde por primera vez se aplicó este término para nombrar al suelo en su totalidad; después para describir al abono de origen animal, a la materia orgánica propia del suelo, y a las SH que se forman en él [2].

Desde un punto de vista geológico, las SH son los intermediarios químicos entre las plantas y los fósiles; son el último producto de descomposición natural aeróbico de toda la materia viviente en presencia de agua. Para que el proceso de humificación (descomposición) se lleve a cabo, se requiere que los restos de

plantas y animales sean digeridos de manera sucesiva por al menos tres especies diferentes de microorganismos apropiados, lo que culmina en la formación de una de las sustancias naturales más complejas de la Tierra, por lo que la naturaleza química de los suelos, de los pantanos y de los sedimentos varía según la transformación y degradación que haya sufrido la materia orgánica de la que provienen [3-4].

El primer estudio relevante del origen y de la naturaleza química de las SH fue hecho por Sprengel en 1839 [2], y hasta la fecha es el más importante. En ese mismo año, el investigador sueco Berzelius contribuyó de manera importante al conocimiento de las SH al aislar dos tipos diferentes de SH, ambas de color ligeramente amarillo, a partir de agua mineral y de barro limoso rico en óxidos férricos [5].

Gracias al profundo estudio de las SH que se han realizado en los últimos 100 años y siguiendo los criterios de Kononova [6], éstas se pueden clasificar y fraccionar en los siguientes grupos:

- AH
- AF
- Huminas

Los AF son moléculas de bajo peso molecular (relativamente), extremadamente complejas, solubles en agua, ya sea a pH ácido o básico; su estructura molecular le confiere sus raras propiedades y naturaleza bioactiva.

En otro sentido, el origen etimológico de los AF proviene de: *ful*, del inglés antiguo *full*, que quiere decir lleno de, que tiene la habilidad o tendencia a; y *vic*, del francés antiguo *vicare* que significa cambio, alteración, doblar y/o cambiar. También existe la palabra *fulvus*, que proviene del latín, la cual significa amarillo intenso, amarillo rojizo, dorado o color moreno.

Es importante mencionar, que la forma correcta de llamar a estos compuestos es ácidos fúlvicos (plural) y no ácido fúlvico, ya que no consisten en una sola sustancia, sino que son un conjunto de sustancias variadas y complejas que reflejan la naturaleza de las planta, animales y especies de los microorganismos que les dieron origen durante el proceso de humificación [7].

1.2 Formación, composición y estructura de los Ácidos Fúlvicos

La formación de las SH es uno de los aspectos de la química del *humus* menos esclarecidos y más intrigantes. Por varios años se han propuesto varias rutas por las cuales se forman las SH a partir del decaimiento natural de plantas y animales que yacen en el suelo. Sin embargo, solo dos de los mecanismos propuestos especifican la formación de los AF. La teoría popularizada por Waksman [2], fue que las SH son el resultado de modificaciones hechas a estructuras de lignina (Figura 1). De acuerdo con esta teoría, la lignina es utilizada de forma incompleta por microorganismos, generando con ello residuos que terminan siendo parte del *humus* del suelo. La modificación de la lignina involucra la pérdida de grupos metoxilo (-OCH₃) y la generación de *o*-hidroxifenoles, así como la oxidación de cadenas alifáticas laterales que generan grupos -COOH. El material modificado está sujeto a cambios futuros desconocidos que dan origen a los AH y a los AF.

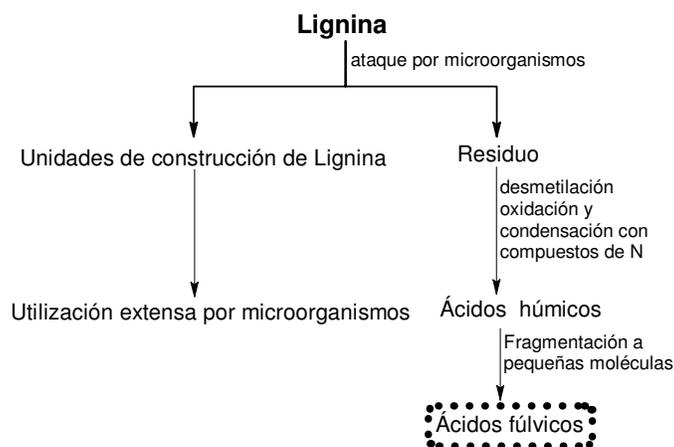


Figura 1. Teoría de la formación de SH a partir de la lignina según Waksman [2].

A pesar de que la teoría de la lignina es comúnmente considerada para explicar la formación de SH, hoy en día la mayoría de los investigadores están a favor de las rutas propuestas por Stevenson [2], mismas que involucran quinonas; estas rutas se ilustran en las Figuras 2 a) y 2 b).

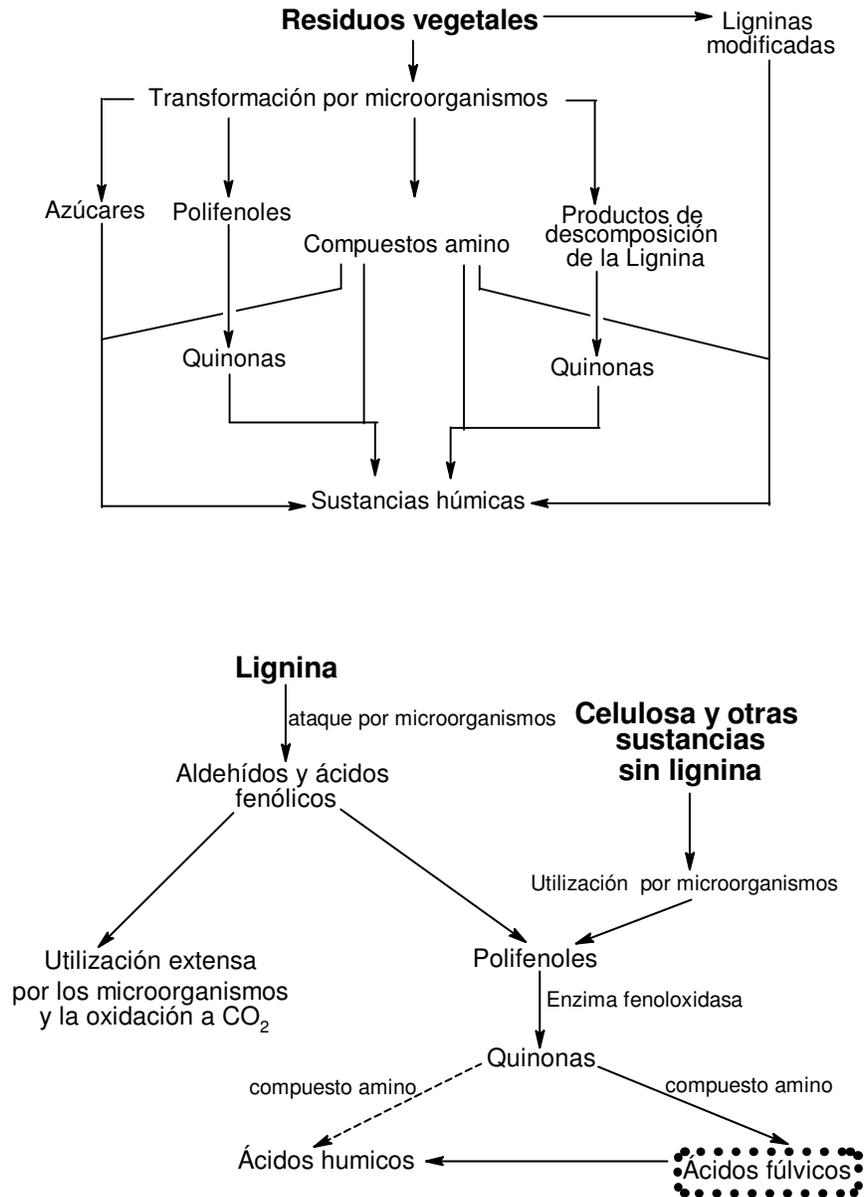


Figura 2. Rutas de formación de *humus* propuestas por Stevenson basadas en la formación de quinonas [2].

En la ruta (a) no se contempla la formación de AF, sin embargo, la ruta (b) de la Figura 2, muestra que los ácidos y aldehídos fenólicos son liberados a partir de la lignina durante la degradación microbiana y posteriormente transformados a polifenoles. Los polifenoles formados sufren posteriormente una conversión enzimática a quinonas, las cuales polimerizan en presencia o ausencia de compuestos amino para formar moléculas de AH, o AF que posteriormente se polimerizan para generar más AH.

Asimismo, Stevenson [2] propone un tercer mecanismo para la formación del *humus*, basado en la condensación de aminocompuestos que involucran azúcares (Figura 3).

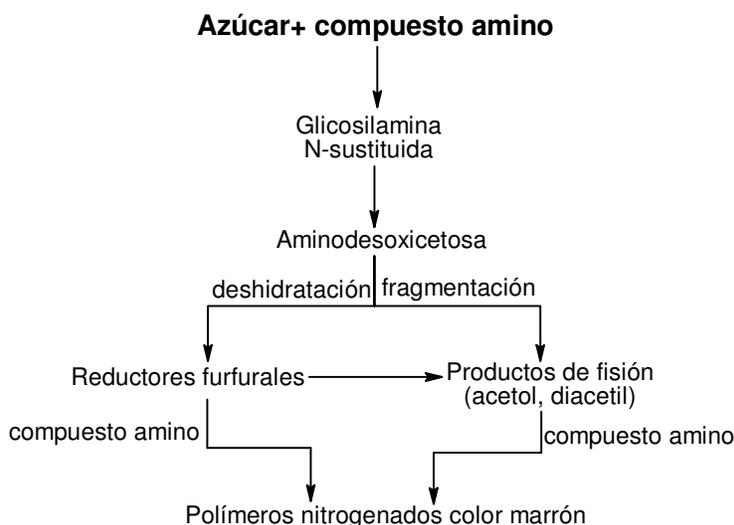


Figura 3. Ruta de la formación de *humus* propuesta por Stevenson basada en la condensación de aminocompuestos a partir de azúcares [2].

Se ha propuesto que los cuatro caminos pueden suceder en cualquier tipo de suelo pero no en la misma proporción ni en el mismo orden de importancia. Por ejemplo, la teoría de la lignina podría predominar en suelos pobremente drenados, así como en sedimentos lodosos (p. ej. en pantanos). En cambio, en ecosistemas con frecuentes y extremas fluctuaciones de temperatura, humedad e irradiación de la superficie del suelo, se podría favorecer la condensación de aminocompuestos a partir de azúcares.

En cuanto a la composición elemental de diferentes AH y AF, los estudios realizados muestran que la mayoría de los elementos que los conforman son C, H, O, N y S, los cuales están presentes independientemente del país o continente en el que se originaron [8-9]. Asimismo, los AF contienen una mayor cantidad de grupos funcionales en su estructura, particularmente grupos -COOH, es decir, la cantidad de grupos ácidos en los AF (900-1400 mmol/100g) es considerablemente mayor que en los AH (400-870 mmol/100g). Otra diferencia importante es que en los AF la mayor parte el oxígeno se encuentra en diferentes grupos funcionales (-COOH, -OH, =C=O); mientras que en los AH el oxígeno forma parte del núcleo de su estructura.

La caracterización de la estructura de las SH es el mayor problema que se presenta durante su estudio, porque no son de tamaño ni composición homogénea. Han existido varias propuestas para la estructura tanto de AH como para AF, las cuales han surgido al relacionar su comportamiento con el de estructuras conocidas, así como de tomar en cuenta su posible origen. En la Figura 4 se muestran algunas de las estructuras propuestas para los AF.

En las imágenes que se presentan en la Figura 4 se aprecia que no se ha establecido una estructura concreta para los AF, pero la mayoría de las estructuras hipotéticas coinciden en ser moléculas pequeñas (en relación con las propuestas para los AH), con muchos grupos funcionales, en su mayoría grupos -COOH, contener pocos anillos en su estructura y que los grupos funcionales están unidos mediante cadenas alifáticas.

1.3 Propiedades y aplicaciones de los Ácidos Fúlvicos

Tanto los AH como los AF son de gran importancia en los cultivos, ya que evitan que las tierras se compacten; ayudan a transferir nutrientes del suelo a la planta, aumentan la capacidad de retención de agua, incrementan la velocidad de

erminación de las semillas y estimulan la proliferación de la microflora presente en el suelo [13].

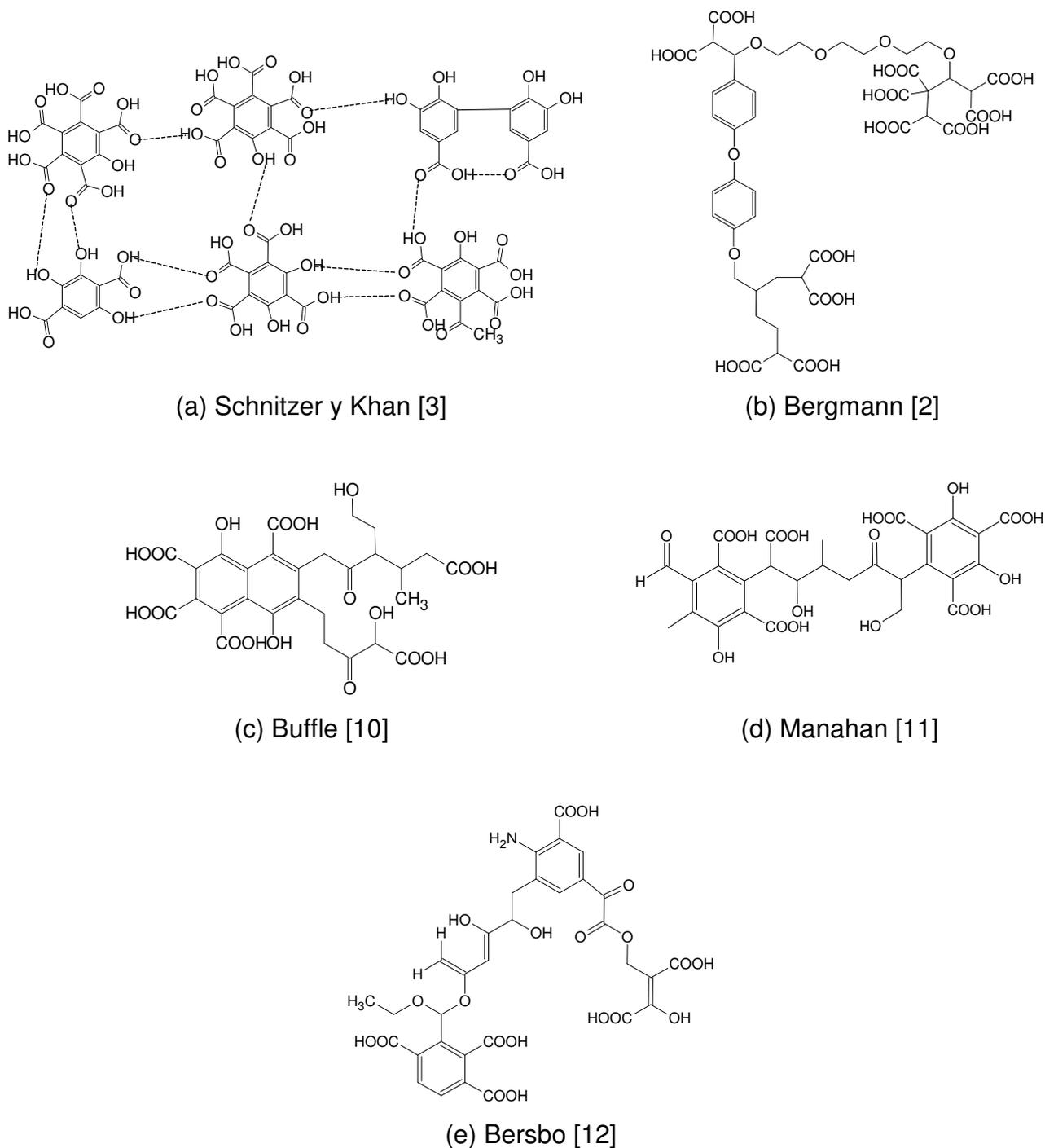


Figura 4. Estructuras hipotéticas de AF, propuestas por Schnitzer y Khan (a), Bergmann (b), Buffle (c), Manahan (d) y Bersbo (e).

Las SH forman sales con cationes de metales alcalinos y alcalinotérreos, así como con algunos otros metales, dando origen a humatos y fulvatos. Algunos de ellos son de alto valor nutricional para las plantas ya que vuelven solubles y asimilables a los metales. Así, por ejemplo, los AF reducen y movilizan al hierro transformándolo de Fe^{3+} a Fe^{2+} .

Como ya se ha mencionado, los AF son moléculas poco polimerizadas con grandes cantidades de grupos carboxílicos, hidróxidos, aminas, unos cuantos anillos aromáticos y cadenas laterales alifáticas de gran longitud. Estos grupos reactivos les proporcionan un carácter global ácido y una elevada capacidad de intercambio catiónico (CIC), por lo que no sólo la roca madre que conforma la arena del suelo es la responsable de este fenómeno. En un suelo, a mayor CIC, mayor es la capacidad y disponibilidad de nutrientes, y por consiguiente mayor su fertilidad, además de que se evitan precipitaciones o bloqueos indeseables de los nutrientes [2]. Por ello se dice que las SH funcionan como reguladores del pH de los suelos y ayudan al proceso de meteorización de las aguas. De esta forma, la labor principal de las SH en el medio ambiente es la de complejar y remover metales, sustancias químicas orgánicas de origen antropogénico y otros contaminantes de las aguas.

En China, el uso de AF es una práctica muy popular, ya que son utilizados para el tratamiento de muchos padecimientos. Esto se debe a las propiedades que se les atribuyen, entre las que destacan: antiinflamatorios, anticoagulantes y por lo tanto promotores de la circulación sanguínea [14-15], útiles en el tratamiento de úlceras del tracto digestivo, del colon y dérmicas; mejoran el sistema inmune, regulan el sistema endocrino, previenen cánceres [16-17] y disminuyen problemas de artritis y reumatismo [18].

Se ha encontrado relación entre personas longevas (120-140 años) que han ingerido preparados con alto contenido de AF durante toda su vida, y que además poseen una gran vitalidad. Estos resultados han propiciado que en geriatría se

haya empezado a tratar a los pacientes con AF para mejorar su calidad ósea, muscular y nerviosa, así como para combatir los estragos de la artritis y diabetes, además de minimizar alergias [19].

1.4 Procesos de extracción y purificación de los Ácidos Fúlvicos

La clasificación de SH comúnmente conocida hasta la fecha (AF, AH y huminas [6]) fue hecha con respecto a su solubilidad, tal como se muestra en la Figura 5. Los AH y los AF representan las fracciones solubles en soluciones acuosas alcalinas, mientras que las huminas representan el residuo insoluble del *humus*. Los AF son separados de los AH a través de la precipitación de éstos últimos, lo cual se logra mediante la acidificación de la solución acuosa en la que se encuentran disueltos. Los AF son solubles a cualquier pH, por lo que permanecen disueltas en el medio acuoso.

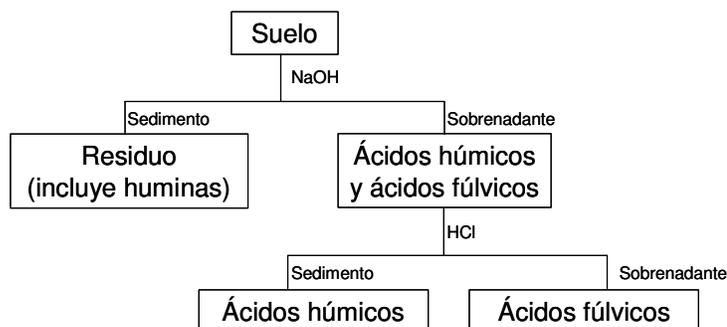


Figura 5. Proceso de separación de los AF, AH y huminas con base a sus solubilidades en medios alcalinos y/o ácidos.

Las propiedades de la materia orgánica del suelo (AH y AF), pueden ser estudiadas adecuadamente únicamente si se encuentran libres de material inorgánico. Existen varias técnicas extractivas, las cuales se emplean dependiendo la naturaleza de la muestra que se vaya a tratar.

Los compuestos no polares como los ácidos grasos, las ceras y las resinas se pueden extraer con solventes orgánicos como hexano, éter, mezclas de

alcoholes bencénicos, entre otros. Durante la extracción se deben tomar en cuenta los siguientes objetivos:

1. La extracción de la materia orgánica debe llevarse a cabo con la menor alteración química posible.
2. La materia orgánica extraída debe estar libre de contaminantes inorgánicos, como pueden ser fragmentos minúsculos de roca madre y cationes polivalentes.
3. La extracción debe ser completa y las fracciones obtenidas deben ser representativas, es decir, que el peso molecular promedio corresponda al peso promedio esperado.
4. El método debe ser universalmente aplicable para cualquier suelo.

En la Tabla 1 se listan algunos de los extractantes de SH más utilizados [2].

Tabla 1. Extractantes de SH comúnmente utilizados.

<i>Extractante</i>	<i>% aproximado de SH extraídas</i>
NaOH	80 %
Na ₄ P ₂ O ₇ y otros	30 %
Agentes orgánicos quelatantes	30 %
Ácido Fórmico	55 %

A continuación se explica de manera más amplia el procedimiento llevado a cabo para cada uno de los extractantes.

Extracción alcalina (NaOH)

Este es el proceso extractivo más comúnmente utilizado, y comienza por el lixiviado del suelo con HCl de baja concentración. Permite remover calcio y cationes polivalentes, además de que se incrementa la extracción de materia orgánica que se obtiene en el siguiente paso de este proceso.

A continuación se utiliza una solución de NaOH, cuya concentración comúnmente varía de 0.1 a 0.5 M, manteniendo una relación de g de suelo por mL

de solución de NaOH de 1:2 a 1:5 (g/mL). Este paso puede repetirse varias veces para obtener la mayor cantidad de materia orgánica posible. Comúnmente es posible extraer dos terceras partes del total de la materia orgánica con este método. Sin embargo, los inconvenientes de éste método extractivo son:

1. Las soluciones alcalinas disuelven la sílica del material mineral, lo que contamina la fracción orgánica que se encuentra en la solución acuosa.
2. Las soluciones alcalinas también disuelven los componentes estructurales y protoplasmáticos de los tejidos orgánicos frescos, que posteriormente se mezclan y contaminan al *humus* presente en el suelo.
3. En solución alcalina pueden ocurrir otros cambios químicos como condensaciones entre aminoácidos y aldehídos o quinonas.

Es por ello que entre más alcalina sea la solución extractante, así como mayor el periodo de tiempo en el que se trata la muestra, mayores son los cambios químicos que se pueden producir en ella, a pesar que se observa que la cantidad de materia orgánica extraída es mayor.

Na₄P₂O₇ y otras sales neutras

En muchos suelos, el calcio y algunos cationes polivalentes (Fe, Al) son los responsables de mantener la materia orgánica en forma de flóculos insolubles. Esta es la razón por la que para extraer a las SH se utilizan reactivos que compitan por estos cationes, evitando con ello que se formen los complejos insolubles de las SH. Estos reactivos pueden ser oxalato de amonio o pirofosfato de sodio. La sal más ampliamente utilizada es el Na₄P₂O₇, a pesar de que sólo se llega a extraer un 30% de la materia orgánica de la muestra del suelo, con la ventaja que no ha sufrido modificaciones químicas muy drásticas como en la extracción con NaOH. Sin embargo, para minimizar los cambios en el material húmico, la extracción se debe llevar a cabo a pH 7.0.

Agentes orgánicos quelatantes

Los compuestos orgánicos como la acetilcetona, cupferrón e hidroxiquinolina son capaces de formar quelatos con iones metálicos polivalentes, generando el mismo efecto que las sales como $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ y el oxalato de amonio. Es decir, compiten y ganan los iones metálicos, evitando con ello que se formen humatos y fulvatos insolubles [2].

Ácido fórmico

La extracción de la materia orgánica del suelo con ácido fórmico muestra que bajo ciertas condiciones es posible extraer entre un 55 y un 80 % de la materia orgánica. La variación del porcentaje se debe a que con el ácido fórmico debe haber LiF , LiBr o HBF_4 (para romper los puentes de hidrógeno y/o complejos con iones metálicos existentes en la muestra a tratar). El ácido fórmico es un buen solvente para una amplia variedad de compuestos, incluyendo polisacáridos, además de ser el extractante más eficiente para suelos donde la mayor parte de la materia orgánica se encuentra parcialmente humificada.

Método IHSS

Existe una técnica de extracción muy importante, la cual fue propuesta por la Asociación Internacional de Sustancias Húmicas (IHSS) [20], la cual se basa en la solubilidad de las SH en medios acuosos de diferentes pH, es decir, que las huminas son insolubles en cualquier intervalo de pH, que los AH son insolubles en medio ácido y que los AF son solubles en todo el intervalo de pH. En la Figura 6 se muestran a grandes rasgos los pasos a seguir para extraer y purificar AF por esta técnica.

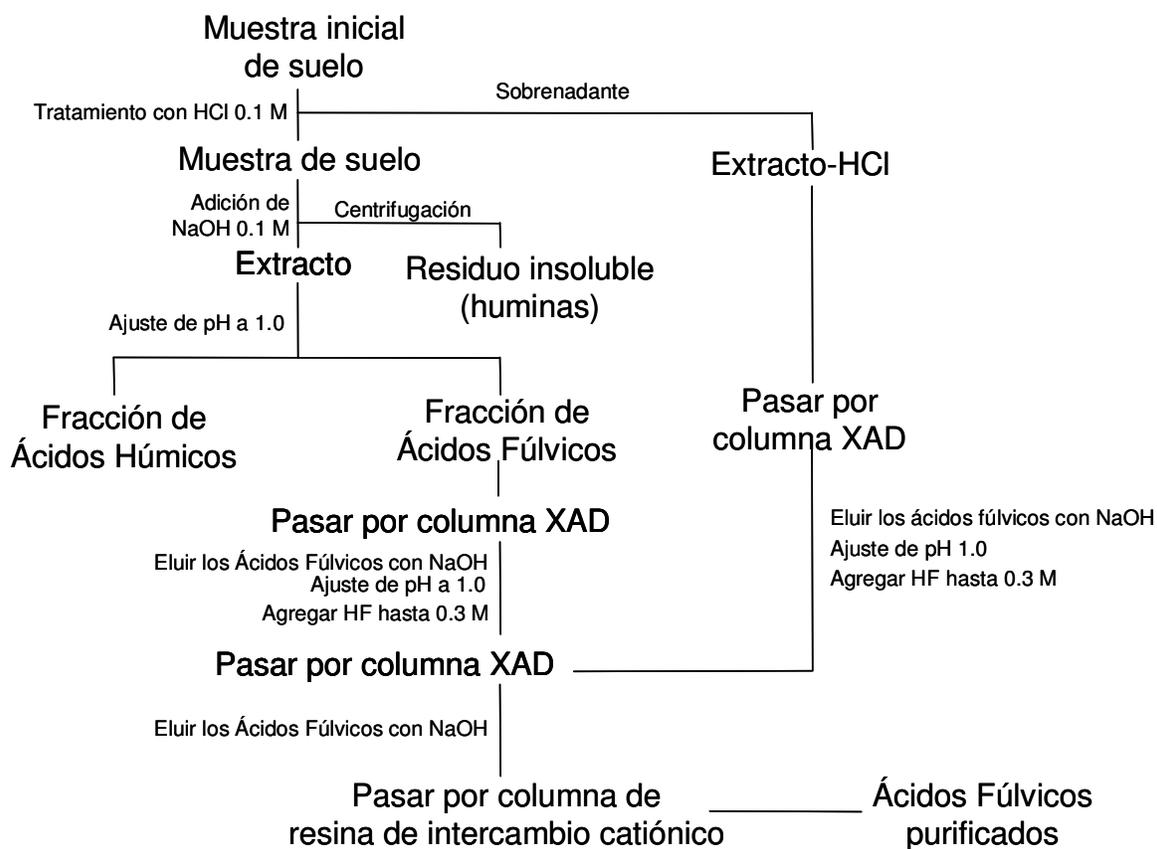


Figura 6. Diagrama descriptivo de los pasos a seguir para extraer y aislar AF mediante el método IHSS.

Cabe resaltar que no se indican los pasos de purificación de los AH porque dichos ácidos no son de interés en este trabajo.

1.5 Técnicas experimentales utilizadas para el estudio de los Ácidos Fúlvicos

Los AF son moléculas muy complejas que siguen siendo un campo de estudio muy vasto y relativamente poco estudiado. Los AF se pueden estudiar de muchas maneras porque falta mucho por conocer de ellos, y por eso, cualquier aportación seria acerca de su comportamiento y funciones químicas ayuda a comprenderlos mejor.

Como en todo campo de estudio, se debe empezar a investigar desde lo más sencillo hasta lo más complicado. A la fecha se ha tratado de conocer el peso o masa molecular promedio de los AF, su estructura (grupos químicos), los protones disponibles en los AF y los grupos funcionales que les confieren sus propiedades ácido-base.

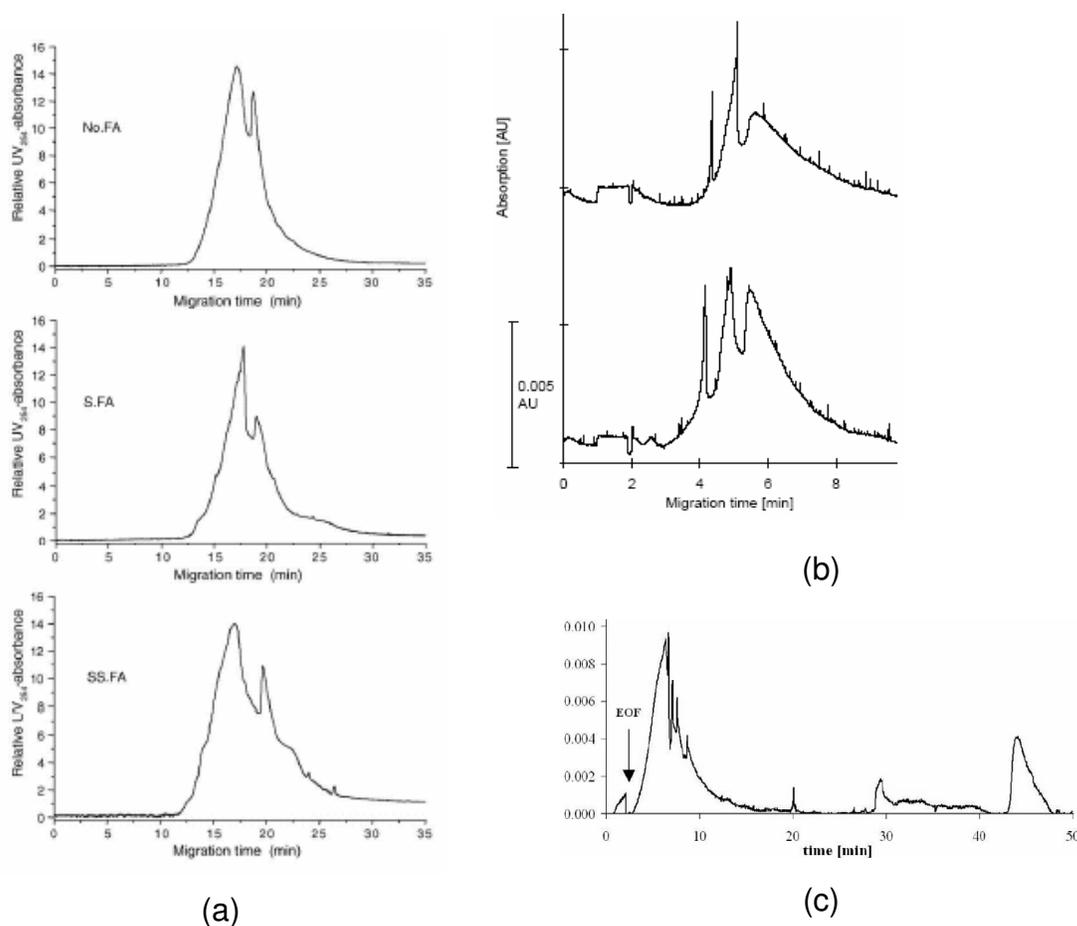
Para conocer el peso o masa molecular promedio, se han hecho estudios con técnicas como cromatografía de exclusión por tamaño de alta resolución (CEPAR) [21-22], fraccionamiento campo-flujo (FCF) [23], espectrometría de masas de ionización por electrospray (EMIE) [24-25], cromatografía de exclusión por tamaño (CET) [26-27], resonancia magnética nuclear (RMN) [28] y espectrometría de masas de ionización por desorción de láser y transformada de Fourier (EMIDLTF) [29].

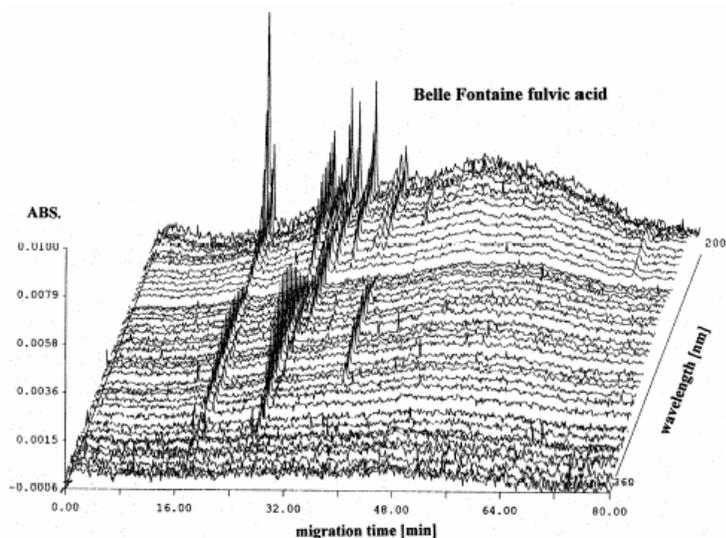
A pesar de la complejidad de las moléculas de AF, se ha tratado de conocer los grupos funcionales que los conforman y elucidar sus estructuras mediante diferentes técnicas; algunas de ellas son: RMN [30-34], cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) [35], ultrafiltración con membranas [36] y fraccionamiento con enzimas, las cuales son capaces de romper de forma específica determinados enlaces, lo que permite deducir que grupos funcionales se encontraban inicialmente en la molécula de AF [37].

Aún sin conocer con certeza la estructura de los AF, se sabe que tienen grupos funcionales con protones lábiles, por lo que sus propiedades ácido-base han sido estudiadas por medio de sus entalpías de ionización y de protonación a través de titulaciones calorimétricas ácido-base [38] y espectrometría de masas con detección de resonancia de iones con ciclotron y transformada de Fourier (EMDRICTF) [39].

Los AF también se han estudiado por electroforesis capilar (EC), tratando de comparar señales de sustancias conocidas (ácidos orgánicos) con las

obtenidas de los AF, con la finalidad de correlacionar los grupos funcionales o estructuras químicas que pudieran estar presentes en la muestra analizada, o simplemente para tratar de encontrar las señales características de los AF [40-45]. Ejemplos de los electroferogramas que se encuentran en la literatura son los que se muestran en la Figura 7.





(d)

Figura 7. Ejemplos de electroferogramas de AF reportados en la literatura. (a) Diferentes AF 0.15 mg mL^{-1} disueltos en urea 5 M; buffer de fosfatos 40 mM pH = 6.8; capilar de sílice cubierto de PVA; 10 kV; $L_t = 64.5 \text{ cm}$; $L_d = 56 \text{ cm}$; d. i. = $100 \mu\text{m}$; $\lambda = 254 \text{ nm}$ [46]; (b) AF estándar Suwannee River disuelto en NaOH, d. i. = $75 \mu\text{m}$, $L_t = 50 \text{ cm}$; buffer de KH_2PO_4 (3 mM) - $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ (6 mM) con pH 8.9; $T = 30^\circ \text{C}$; 30 kV; $\lambda = 214 \text{ nm}$ [47]; (c) AF Bouzule Pseudogley soil disuelto en SDS 100 mM; buffer de carbonatos (25 mM) - SDS (100 mM) pH = 9.2; $L_t = 57 \text{ cm}$; $L_d = 50 \text{ cm}$; $\lambda = 325 \text{ nm}$ [44]; (d) Electroferograma de AF en tres dimensiones; buffer de acetatos 50 mM pH = 5.0; 25 kV; 30°C ; $L_t = 100 \text{ cm}$; d. i. = $50 \mu\text{m}$ [40].

1.6 Estudios de la interacción Ácidos Fúlvicos-metal

Los metales pesados son algunos de los componentes de la roca madre de la que está compuesto el suelo, los cuales son transportados hasta los mantos acuíferos, las fuentes de agua potable, así como a los sistemas marinos. Esto se debe a la movilidad de los metales en su forma iónica, o cuando se encuentran como complejos metálicos orgánicos [48].

Concretamente, la materia orgánica en solución acuosa es capaz de: (1) complejar metales e incrementar su solubilidad, (2) alterar la distribución de la forma oxidada o reducida de los metales, (3) reducir la toxicidad de los metales y alterar su biodisponibilidad hacia la vida acuática.

Si bien los AF acuáticos y los de origen terrestre que se encuentran en solución acuosa pueden liberar los iones metálicos que se encuentran adsorbidos en sedimentos, también son capaces de secuestrar iones metálicos que se encuentran en solución cuando la materia orgánica (entre ella *humus*) se encuentra adsorbida en los sedimentos.

En los AF existen muchos grupos funcionales que contienen en su estructura átomos de oxígeno que se asocian con iones de metales alcalinotérreos (comúnmente Ca y Mg) y metales de transición (p.ej. Cu, Fe, Cd, Zn, V y Ni). Los cationes monovalentes como Na^+ y K^+ pueden formar enlaces electrostáticos débiles con un solo grupo funcional de los AF, mientras que los iones metálicos divalentes pueden complejarse con dos sitios aniónicos adyacentes formando con ello un quelato, que posee una unión mucho más fuerte que la formada con cationes monovalentes [5].

Entre los métodos más utilizados para el seguimiento de la complejación de los metales con los AF se encuentran los electrodos selectivos de iones (ESI's) [49-51], voltamperometría anódica [51] y catódica [52]. En ocasiones se utiliza la ^{13}C -RMN [53-56] para seguir de forma indirecta la complejación del metal con los AF y cuando se cuenta con equipos más especializados se puede seguir la complejación mediante los cambios que presentan los espectros de RMN del metal que se esté estudiando [57-59]. Otras técnicas utilizadas son la EMDRICTF [60] y microanálisis electroforético [61]. Esta última técnica se basa en el uso de una columna donde se llevan a cabo reacciones químicas (como la de complejación AF-metal) y que además sirve para hacer una separación electroforética simultánea de los productos. Sin embargo, en dicho estudio se muestran electroferogramas donde aparentemente los AF no generan absorbancia alguna, sino que empiezan a aparecer señales hasta la formación del complejo AF-metal. Es decir, éste método no permite ver las señales generadas únicamente por los AF ni la modificación del perfil del electroferograma al generarse el complejo.

La aportación de este trabajo referente a la interacción de AF con metales por EC y por espectroscopía UV/Vis, es de gran importancia, ya que contribuye a esclarecer las condiciones necesarias para el análisis de AF por EC, mostrando las dificultades que se presentan durante su estudio y la forma de solucionarlas, así como también las diferencias existentes entre la interacción de los AF con cada uno de los diferentes metales y sus respectivas constantes de complejación obtenidas a partir de estudios espectrofotométricos.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Analizar y caracterizar AF de diferente fuente y origen, y estudiar su interacción con algunos metales pesados presentes en los suelos.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar los AF de diferente fuente (suelo y turba).
- Desarrollar un método eficiente de análisis para el estudio de los AF por EC.
- Aplicar el método electroforético desarrollado anteriormente para la comparación de los AF extraídos de un suelo de Tulancingo (municipio perteneciente al estado de Hidalgo, México) con muestras de AF estándar.
- Estudiar la interacción de los AF con algunos metales pesados (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}) por EC.
- Determinar las constantes de equilibrio aparentes de los complejos AF-Metal (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}) a partir de información espectrofotométrica, con ayuda del programa computacional SQUAD.

3. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ÁCIDOS FÚLVICOS

3. EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ACIDOS FULVICOS

La caracterización de los AF utilizados es una parte importante de su estudio, porque permite correlacionar su comportamiento con posibles grupos y estructuras químicas. Los AF de este estudio fueron caracterizados mediante análisis elemental, determinación de cenizas, espectroscopía UV/Vis y espectroscopía de infrarrojo.

3.1 Equipo y reactivos

Para la extracción, purificación y caracterización de AF, todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua desionizada obtenida de un equipo Milli-Q (Millipore) (18.2 MΩ/cm). Todos los reactivos fueron de grado analítico (Aldrich) y se emplearon tal y como fueron adquiridas del proveedor. Las resinas utilizadas fueron AMBERLITE XAD7-HP (Rohm & Haas) y DOWEX 50W-X8 (DOWEX).

En cuanto a los equipos utilizados, los estudios de análisis elemental se realizaron en un equipo Serie II CHNS/O 2400 Perkin-Elmer. El proceso de calcinación para determinar el contenido de cenizas se realizó en una mufla Felisa modelo 33JE con capacidad de calentamiento de 0 a 1100 °C. Finalmente, los estudios espectroscópicos de UV/Vis e infrarrojo se realizaron en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Lambda 40, y en un equipo Perkin Elmer modelo Spectrum GX, respectivamente.

3.2 Extracción de los Ácidos Fúlvicos

3.2.1 Ácidos Fúlvicos en estudio

Para la realización de este trabajo, se caracterizaron tres AF de diferente fuente y origen: dos AF estándar adquiridos de la IHSS y uno extraído de territorio

hidalguense. Los AF estándar denominado AF Elliott Soil, fue extraído de un suelo perteneciente a Illinois, Estados Unidos, donde el agua drena lentamente, el suelo es de color oscuro, la precipitación anual es de 84 cm y la temperatura es aproximadamente de 18 °C. En cambio, los AF estándar Pahokee Peat fueron extraídos de turba (masa fibrosa y esponjosa formada por la descomposición de musgos y otras plantas que perecen por falta de oxígeno y se van depositando en el fondo de los pantanos) de un suelo pantanoso perteneciente a Florida, Estados Unidos, el cual cuenta con un drenado pobre y es el resultado de depósitos orgánicos provenientes de cuerpos de agua dulce [62]. Finalmente, los AF extraído en el laboratorio fueron provenientes de una parcela del municipio de Tulancingo, perteneciente al estado de Hidalgo, México, en donde el clima es templado-frío y registra una temperatura media anual de 15 °C; la precipitación pluvial oscila entre 50 y 70 cm por año, además cuenta con humedad que genera niebla ocasional [63].

3.2.2 Toma de muestra de suelos

La toma de una muestra de suelo es una tarea muy importante de la que depende el valor del análisis, por lo que la muestra debe ser representativa de la zona. Las muestras de suelo se toman hasta una profundidad máxima de 20 cm, y pueden hacerse mediante tres técnicas:

- a) Utilizando una barrena de 30 a 35 cm de longitud y una rosca de unos 3 cm de diámetro.
- b) Empleando una sonda de 20 cm de longitud y terminada en una punta filosa.
- c) Por medio de una pala o azadón.

Para este estudio se hizo la toma de muestra mediante una pala (Figura 8), con ella se cavó un hoyo en forma de V, de unos 20 cm de profundidad, se cortó una

rebanada de uno de los lados y la parte central de la rebanada se pasó a la bolsa en la cual se estaba almacenando la muestra.

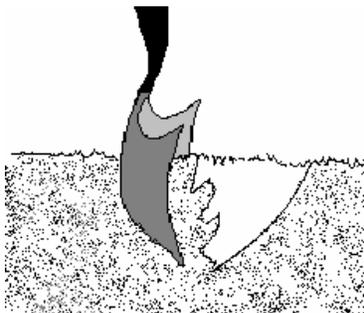


Figura 8. Toma de muestra de suelo por medio de pala.

La operación anterior se repitió hasta completar 2 kg de tierra, con el fin de que la muestra fuera representativa, según lo recomendado por Yufera *et al.* [1].

3.2.3 Preparación de la muestra para la extracción

Antes de proceder a la extracción de los AF, la muestra de suelo se secó al aire a temperatura ambiente durante aproximadamente 24 h, que es el tiempo mínimo que se debe dejar airear una muestra de suelo. Esto se hizo debido a que los resultados analíticos se deben referir a muestras secadas al aire.

Una vez seca la muestra de suelo, se retiraron las piedras, se rompieron los agregados y finalmente se procedió a tamizar, porque agronómicamente sólo tienen verdadero interés las partículas que tienen un tamaño inferior a 2 mm de diámetro medio, en cuya superficie se lleva a cabo casi la totalidad de las reacciones del suelo [1].

3.2.4 Extracción y purificación de Ácidos Fúlvicos

Para la extracción (a temperatura ambiente) de los AF del suelo de Tulancingo se realizaron los siguientes pasos:

- Paso 1.* Se pesaron 50 g de muestra, a la cual se le adiciona la cantidad mínima necesaria de agua desionizada para mantenerla en suspensión. Posteriormente se le midió el pH y se ajustó 1 adicionándole HCl 1.0 M. Posteriormente se adicionaron 500 mL de HCl 0.1 M para conseguir una relación de 10 mL de solución por cada gramo de suelo seco. Una vez preparada la suspensión, se agitó de manera continua durante 1 hora.
- Paso 2.* Se detuvo la agitación y se permitió que la suspensión sedimentara durante 4 horas. Posteriormente se decantó la primera fracción de AF obtenida (sobrenadante) y se reservó para su posterior tratamiento.
- Paso 3.* El sedimento se neutralizó hasta pH 7 con NaOH 1.0 M; a continuación, y bajo atmósfera de N₂, se le adicionaron 500 mL de NaOH 0.1 M para mantener de nuevo la relación 10:1 de extractante:suelo seco inicial.
- Paso 4.* La suspensión alcalina se mantuvo bajo atmósfera de N₂ y con agitación continua durante 4 h. Al término de este tiempo se dejó sedimentar durante aproximadamente 14 h. Posteriormente, ya que se distinguieron dos fases, se decantó el sobrenadante de la solución y el sedimento (huminas) se descartó.
- Paso 5.* El sobrenadante que se obtuvo en el paso 4 se mantuvo en constante agitación mientras se acidificó con HCl 6 M hasta alcanzar un pH de 1. Una vez realizado esto, la solución se dejó en reposo durante aproximadamente 14 h para que se separara.
- Paso 6.* Después del tiempo de reposo, se apreciaron dos fases bien definidas, las cuales correspondieron a la segunda fracción de los AF (fase superior) y a los AH (fase inferior). Estas fases se separaron con mucho cuidado de no mezclarlas; lo cual se logró con la ayuda de una pipeta Pasteur, para evitar que la fase inferior contaminara la fase superior.
- Paso 7.* La primera fracción de AF (proveniente del paso 2) y la segunda fracción que se obtuvo en el paso 6 se mezclaron y se filtraron en un embudo Buchner con papel filtro Whatman 42 y una cama de algodón, con la finalidad de atrapar cualquier sólido suspendido que pudiera quedar en la solución de AF.

- Paso 8.* La solución libre de sólidos suspendidos y en la que están presente los AF se pasó través de una columna empacada con 65 g de resina AMBERLITE XAD7-HP. Se descartó el eluato, se enjuagó la columna AMBERLITE XAD7-HP con agua desionizada, y se descartó el agua de lavado.
- Paso 9.* Los AF atrapados en la columna AMBERLITE XAD7-HP se eluyeron con 150 mL de NaOH 0.1 M y 700 mL de agua desionizada.
- Paso 10.* Todos los eluatos que se obtuvieron del paso 9 se colectaron y se acidificaron inmediatamente con HCl 6.0 M hasta un pH de 1. Posteriormente se adicionaron los mL de HF concentrado necesarios para tener una concentración final de HF 0.3 M.
- Paso 11.* La solución ya acidificada con la mezcla HCl-HF se volvió a eluir a través de la columna empacada con resina AMBERLITE XAD7-HP, se enjuagó la columna con agua desionizada y se descartaron los eluatos.
- Paso 12.* Los AF atrapados en la columna AMBERLITE XAD7-HP se recuperaron al adicionar 150 mL de NaOH 0.1 M y 700 mL de agua desionizada. Todas las aguas de lavado obtenidas en este punto se colectaron y se vertieron en una columna empacada con 110 g resina de intercambio catiónico DOWEX 50W-X8, con el fin de recuperar los AF purificados, saturados de H⁺, y no como fulvato de sodio.
- Paso 13.* Por último se concentró (mediante evaporación) el eluato proveniente de la columna catiónica hasta tener los AF secos.

Durante el proceso de purificación se realizaron ciertas modificaciones al método original propuesto por la IHSS. Una de ellas fue el cambio de la resina AMBERLITE XAD8 por la resina AMBERLITE XAD7-HP la cual también es utilizada para la purificación de AF [64]; sin embargo se empleó un exceso de ella durante su empaquetamiento en la columna, procurando con ello evitar la saturación de la misma y por consiguiente, la obtención de una muestra contaminada con silicatos, además de compensar de alguna manera el cambio de resinas. La otra variación que se hizo fue la utilización de la resina DOWEX 50W-

X8 en lugar de la resina Bio-Rad AG-MP-5, considerando que ambas son resinas de tipo catiónico [65].

Tomando en cuenta las modificaciones realizadas a la técnica, el rendimiento de AF fue de 3.394 mg/g suelo seco inicial.

3.2.5 Preparación de soluciones acuosas de Ácidos Fúlvicos

La preparación de soluciones pudiera parecer un paso trivial, sin embargo, para el caso de las SH, los investigadores del tema no han coincidido al establecer un peso molecular único para los AH ni para los AF, de tal forma que a la fecha solamente existen aproximaciones. En la mayoría de los casos, se encuentran reportados intervalos entre los que podrían oscilar los valores de sus pesos moleculares. Para este trabajo, se tomó en cuenta el intervalo de 500 a 1500 g mol⁻¹ [66] y se obtuvo el promedio de estos valores, por lo que para la preparación de soluciones, se consideró un peso molecular promedio de 1000 g mol⁻¹. A partir de esta consideración se prepararon las soluciones pesando los gramos de AF necesarios y aforando al volumen de agua requerida.

3.3 Caracterización de los Ácidos Fúlvicos

3.3.1 Análisis elemental

Por medio de análisis elemental se determinaron los porcentajes totales de los componentes elementales (carbono, hidrógeno y nitrógeno) a partir de las muestras sólidas de AF.

3.3.2 Contenido de cenizas

La determinación de cenizas se realizó por duplicado para los AF de Tulancingo y una sola vez con los estándares comerciales, esto último debido a que no se contaba con la cantidad suficiente para repetir el experimento.

Para éste análisis se pesaron los crisoles a utilizar y posteriormente se metieron en una mufla que se mantuvo a 900 °C durante 40 min. Pasados los 40 min, los crisoles se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvieron a pesar; esta operación se repitió hasta observar peso constante. Posteriormente, en cada uno de los crisoles se pesó con exactitud 0.0150 g de los AF extraídos y estándar respectivamente y se metieron de nuevo a la mufla, donde permanecieron durante 6 horas a 900 °C. Una vez transcurridas las 6 horas se sacaron, se dejaron enfriar a temperatura ambiente y se volvieron a pesar para poder conocer la cantidad de materia inorgánica presente en las muestras.

3.3.3 Espectroscopía Ultravioleta/Visible

Los espectros de UV/Vis de los diferentes AF en un intervalo de longitud de onda de 200 a 900 nm, se obtuvieron con la finalidad de calcular la relación de absorbancias E_4/E_6 , la cual es comúnmente utilizada para la caracterización de suelos [67].

3.3.4 Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo se obtuvieron a partir de muestras sólidas de AF en pastillas de KBr, los cuales comprenden desde los 4000 a los 370 cm^{-1} , y se utilizaron para identificar los grupos funcionales que estuvieran presentes en las muestras, y con ello relacionar su comportamiento.

3.4. Resultados y discusión

3.4.1 Análisis elemental

Como se mencionó con anterioridad, la mayor parte de los elementos que conforman a los AF, y en general a las SH orgánicas son carbono y oxígeno. En la mayoría de los casos, el contenido de carbono de los AH se encuentra entre el 53.8 y 58.7 % y el contenido de oxígeno varía de 32.8 a 38.3 %. Por el contrario, los AF poseen un contenido ligeramente menor de carbono (generalmente entre un 40.7 a un 50.6 %) y un contenido mayor de oxígeno (39.7 a 49.8 %), ya que cuentan con una mayor cantidad de grupos $-\text{COOH}$, lo que a su vez les confiere un carácter más ácido. Además, los porcentajes de hidrógeno, nitrógeno y azufre varían de 3.2 a 7.0 %, de 0.8 a 4.3 % y de 0.1 a 3.6 % respectivamente [2].

En la Tabla 2 se muestran los resultados obtenidos del análisis elemental de los diferentes AF en estudio. Puede apreciarse que los porcentajes de hidrógeno y nitrógeno presentes en los AF, se ubican dentro del intervalo de valores previstos para este tipo de sustancias, mientras que sus contenidos de carbono y oxígeno son muy cercanos a los valores conocidos para otros AF.

Tabla 2. Análisis elemental y porcentaje de cenizas obtenidos de los AF estándar y de los AF extraídos de un suelo hidalguese (*%O calculado como la diferencia del 100%).

AF utilizados	Análisis elemental				Relación C:H:N:O (átomos)	Relación O/C	Relación H/C
	%C	%H	%N	*%O			
AF de Tulancingo	39.48	4.04	0.45	56.03	102:126:1:109	1.07	1.23
AF Elliott Soil	50.12	4.28	3.75	41.85	16:16:1:10	0.62	1.00
AF Pahokee Peat	51.31	3.53	2.35	42.81	25:21:1:16	0.64	0.84

Una forma de expresar la información del análisis elemental que se realiza para caracterizar a las SH es el uso de relaciones entre átomos; siendo válida tanto para AH como para AF. Algunas generalizaciones respecto a las relaciones O/C y H/C son las siguientes:

- La relación O/C para AH provenientes del suelo es cercana a 0.5, mientras que para los AF es 0.7 o mayor [68]. Esta diferencia refleja el alto contenido de COOH y/o carbohidratos en los AF.
- Comúnmente la relación H/C para AH como AF provenientes del suelo es cercana a 1.0, mientras que para SH provenientes de sedimentos marinos o de lagos suele ser mayor. Para las SH del suelo la relación H/C está directamente correlacionada con la relación E_4/E_6 (punto 3.4.3), la cual es inversamente proporcional a la “aromaticidad” o grado de condensación. Las relaciones H/C bajas indican que el material en estudio es de naturaleza alifática casi en su totalidad [68].

Tomando en cuenta las generalidades anteriores y los valores de la relación O/C obtenidos para los tres AF en estudio, podemos decir que, en cuanto a la cantidad de grupos COOH y/o carbohidratos en los tres AF analizados, el orden decreciente es el siguiente:

AF Tulancingo > AF Pahokee Peat \approx AF Elliott Soil

Por otro lado y de acuerdo a los resultados obtenidos de la relación H/C, el carácter alifático de los AF tiene el siguiente orden:

AF Pahokee Peat > AF Elliott Soil > AF Tulancingo

El bajo porcentaje de nitrógeno encontrado en el suelo de Tulancingo, podría deberse a que la muestra de suelo proviene de una parcela utilizada para el cultivo (maíz), por lo que gran parte de la materia orgánica producida es extraída del lugar con la cosecha, impidiendo con ello su descomposición en el propio lugar

donde se produce, de manera que, a corto o largo plazo, los nutrientes (entre ellos el nitrógeno) que originalmente poseía el suelo se vuelven escasos.

3.4.2 Contenido de cenizas

Luego de realizar los análisis correspondientes, pudo determinarse que los estándares AF Pahokee Peat y AF Elliott Soil contienen un menor porcentaje de material inorgánico en comparación con los AF de Tulancingo (1.515%, 2.759% y 15.099% respectivamente). Estos valores podrían reflejar que los AF de Tulancingo posiblemente contengan sales, ya que después de la calcinación se apreció en el fondo de estos crisoles una delgada capa sólida, transparente y brillante que estaba adherida. Analizando los pasos llevados a cabo en el proceso de purificación, así como los reactivos utilizados, se puede inferir que parte de esos residuos eran NaCl y/o NaF (ésta última en menor cantidad) formados y fundidos, ya que en estado puro, el NaCl funde a 802° C y el NaF a 995 °C [69].

3.4.3 Espectroscopía Ultravioleta/Visible

En la Figura 9 se muestra un espectro típico de AF, el cual se obtuvo utilizando una solución de AF estándar Elliott Soil 1×10^{-7} M; en el puede observarse que los AF absorben en todo el rango del espectro UV debido a la variedad de grupos funcionales que poseen.

Aunque a simple vista los espectros UV/Vis parecen no proporcionar mucha información, la relación de absorbancias a 465 y 665 nm, comúnmente llamadas relación E_4/E_6 (cociente resultante de la relación de absorbancias en 465 nm y 665 nm), es ampliamente usada para propósitos de caracterización. En 1977, Chen *et al.* demostraron la concordancia entre la relación E_4/E_6 con el tiempo de humificación, grado de condensación, peso molecular relativo, así como grado de aromaticidad de los AH y AF propuesta por Kononova en 1966 [67]. De esta forma se encontró que la relación para los AH usualmente es menor a 5.0; mientras que

el rango para los AF generalmente es de 6.0 a 8.5. Esta relación decrece con el incremento del peso molecular y de la condensación, y se piensa que es un indicativo del grado de humificación. Así, una relación E_4/E_6 baja puede indicar un alto grado de condensación de estructuras aromáticas, mientras que una relación E_4/E_6 alta infiere la presencia de estructuras más alifáticas.

Se ha observado otra correspondencia con el valor de la relación E_4/E_6 , la cual indica el tiempo de residencia del material húmico (el tiempo de residencia es el resultado de análisis de ^{14}C para determinar la edad promedio del material húmico), ya que las SH con una alta relación E_4/E_6 tienen poco tiempo de residencia. Así, un material húmico viejo tiene mayor grado de condensación y aromaticidad [2].

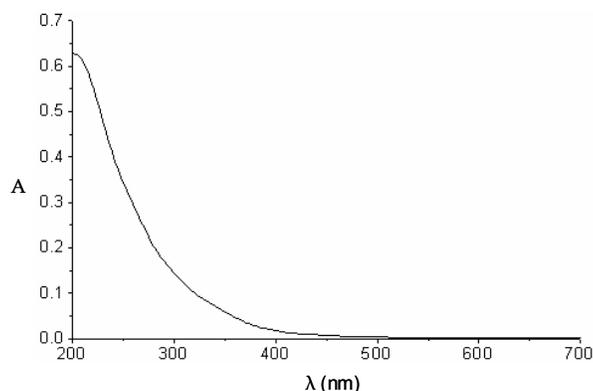


Figura 9. Espectro de UV/Vis de una solución acuosa del AF estándar Elliott Soil 1×10^{-7} M.

A pesar de que los espectros de los tres AF caracterizados presentaron la misma tendencia, existen pequeñas diferencias en las pendientes de sus curvaturas, lo que genera diferentes valores de sus respectivos cocientes E_4/E_6 , los cuales se muestran en la Tabla 3.

A partir de las relaciones de la Tabla 3, podemos deducir que los AF estándar Pahokee Peat tienen corto tiempo de residencia y bajo grado de condensación, es decir que su estructura es más alifática y poseen un peso

molecular menor. En contraste, los AF extraídos del suelo de Tulancingo son los que tienen la relación E_4/E_6 más pequeña; es decir, que su tiempo de residencia y peso molecular es el mayor y se encuentran conformados por más estructuras aromáticas. Finalmente, los AF estándar Elliott Soil poseen características intermedias.

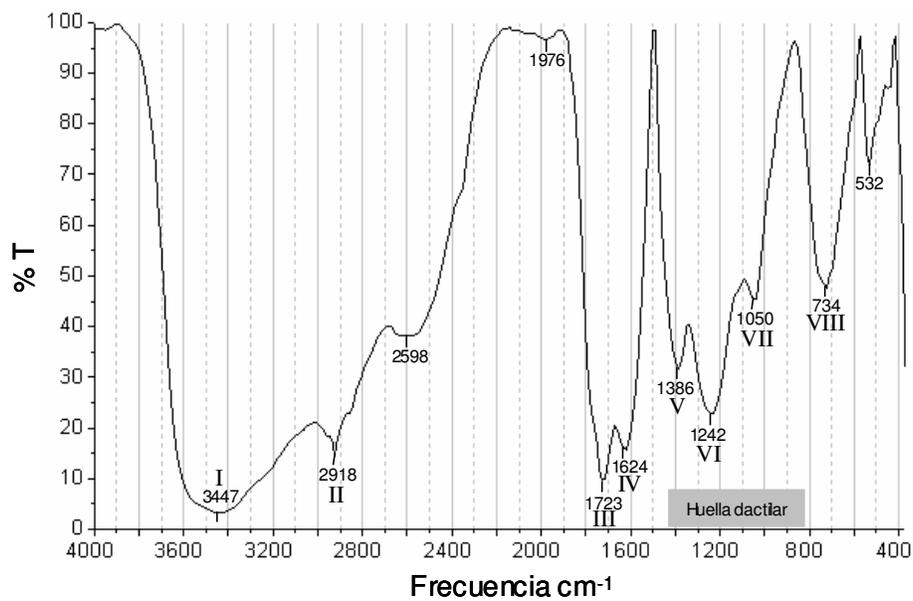
Tabla 3. Valores de los cocientes E_4/E_6 para los diferentes AF en estudio.

Nombre	E_4/E_6
AF estándar Pahokee Peat	10.938
AF estándar Elliott Soil	6.814
AF de Tulancingo	4.649

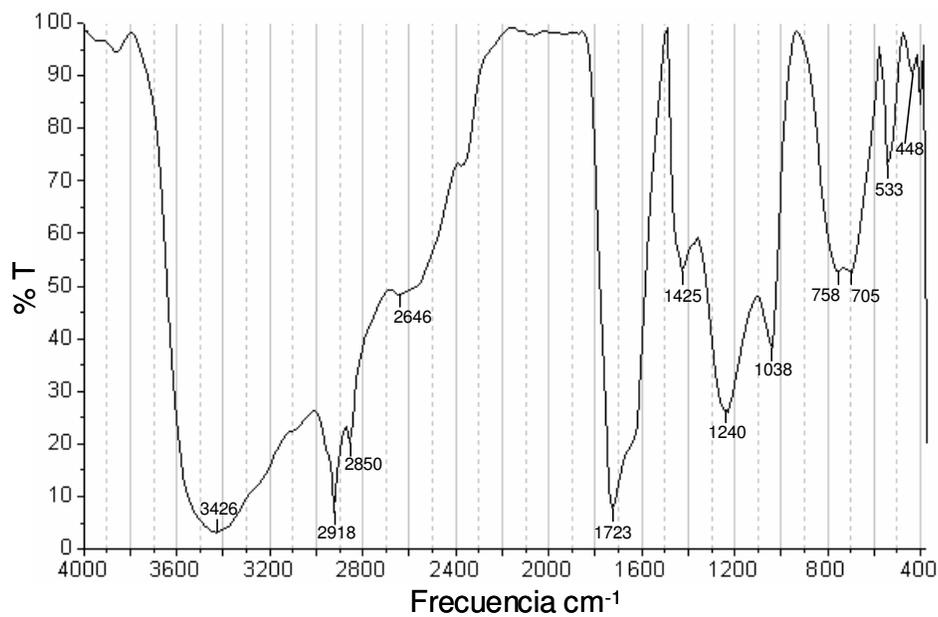
3.4.4 Espectroscopía de Infrarrojo

Los espectros de infrarrojo son de gran utilidad en el análisis y caracterización de SH porque muestran bandas que son el reflejo directo de sus estructuras moleculares. La espectroscopía infrarroja provee información clave acerca de la naturaleza del *humus*, de su actividad y del acomodo estructural de los grupos funcionales que contienen oxígeno. Esta información es esencial para el entendimiento de las interacciones SH-metal, así como SH-sustancias xenobióticas [2], etc. En la Figura 10 se muestran los espectros de infrarrojo de los AF en estudio.

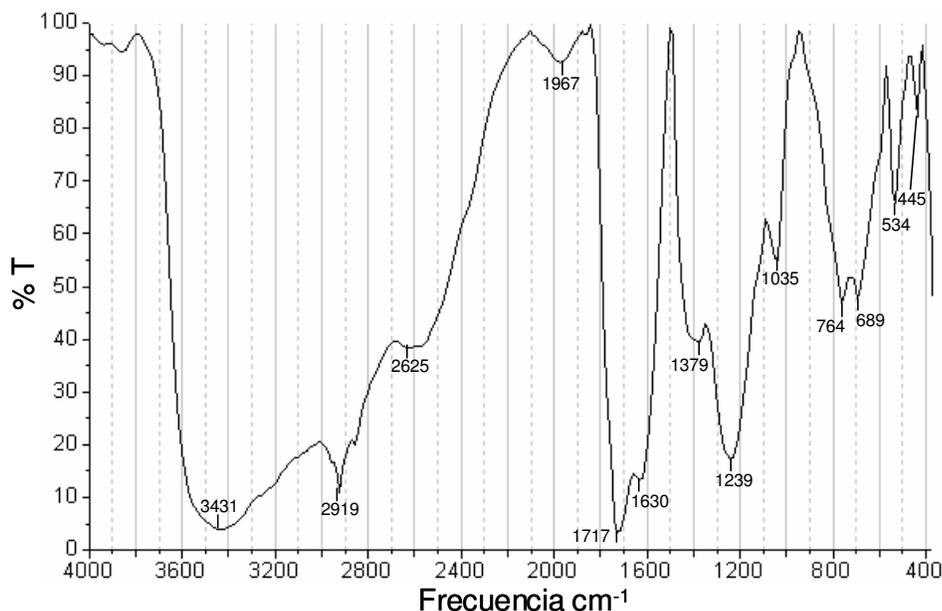
Los tres espectros de la Figura 10 presentan las mismas bandas aunque con pequeñas diferencias de intensidad, lo que revela que los tres AF contienen los mismos grupos funcionales, pero en diferente proporción. La similitud entre los espectros también indica que los AF extraídos del suelo hidalguense se obtuvieron con un mínimo en la modificación de su estructura, cumpliendo con ello el requisito de alterar lo menos posible la materia orgánica mediante la técnica de extracción utilizada, según lo propuesto por Stevenson [2].



(a)



(b)



(c)

Figura 10. Espectros de infrarrojo de los AF analizados obtenidos en pastilla de KBr. (a) AF estándar Pahokee Peat, (b) AF estándar Elliott Soil y (c) AF extraídos de Tulancingo.

En la Tabla 4 se especifica la asignación de las señales etiquetadas en la Figura 10 (a), y que son congruentes con los grupos funcionales que podrían estar presentes en las estructuras de AF propuestas hasta ahora.

La banda a 1700 cm^{-1} (etiquetada como III) proporciona información singular para la caracterización de las SH, ya que esta señal tiende a ser más débil al incrementarse la intensidad de color de las soluciones de SH, lo que a su vez indica una disminución progresiva del contenido de grupos COOH y un incremento en el peso molecular (polimerización) de la muestra [2].

Las señales que se encuentran entre las frecuencias $1430\text{ y }830\text{ cm}^{-1}$ corresponden a las llamadas “huellas dactilares”, que son únicas para cada sustancia y que además son difíciles de asignar porque a partir de 1430 cm^{-1} hasta frecuencias menores, aparecen señales correspondientes a interacciones poliatómicas de la molécula [70].

Tabla 4. Asignación de las bandas de absorción de los espectros de infrarrojo de la Figura 10 (a).

Etiqueta	Frecuencia ~ (cm⁻¹)	Asignación
I	3400-3300	v O-H de alcoholes; v N-H de aminas
II	2940-2900	v C-H alifático (CH ₂)
III	1725-1700	v C=O de COOH y cetonas
IV	1660-1630	v C=O de amida y quinonas
V	1400-1360	v C-O de OH fenólicos, δ CH ₂
VI	1280-1200	v C-O de éteres
VII	1170-950	v C-O de polisacáridos y/o Si-O
VIII	720-740	ρ C-H de CH ₂

4. ESTUDIO POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE LA INTERACCIÓN ÁCIDOS FÚLVICOS - METAL

4. ESTUDIO DE LA INTERACCION ÁCIDO FÚLVICO - METAL POR ELECTROFORESIS CAPILAR

Para llevar a cabo el estudio de la interacción de los AF con metales por EC, se propuso seguir la señal de los metales y los AF en un sólo experimento; sin embargo, no se encontró ningún buffer con el cual se pudiera lograr. Es por ello que este estudio se realizó mediante dos procedimientos diferentes: por un lado, registrando las modificaciones de los electroferogramas de AF una vez que se adicionó la solución de metal, y por otro lado, registrando las modificaciones de los electroferogramas de los iones metálicos una vez que se adicionaron los AF.

Es importante mencionar que durante la experimentación, todas las soluciones utilizadas fueron preparadas con agua desionizada Milli-Q (Millipore) (18.2 MΩ/cm) para evitar contaminación con otros metales. Las sales de nitratos de cada uno de los metales (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+}) y los reactivos utilizados para la preparación de las diferentes soluciones amortiguadoras fueron de grado analítico (Aldrich). En cuanto a los AF, se emplearon los AF extraídos del suelo de Tulancingo y los AF estándar Elliott Soil.

Los electroferogramas se obtuvieron en un equipo Beckman P/ACE MDQ, el cual cuenta con inyector automático y detector de UV ($\lambda = 214 \text{ nm}$); se utilizó un capilar de sílice fundida de 75 μm de diámetro interno, longitud total (L_t) del capilar de 39 cm y longitud al detector de 28.5 cm (L_d).

4.1 Seguimiento de la señal de los Ácidos Fúlvicos y su alteración debido a la adición de metal.

Para obtener información acerca de la interacción de AF-metal se buscaron las condiciones óptimas que generen los electroferogramas para AF libres, y posteriormente observar la modificación de los mismos por la adición de cationes metálicos (M^{2+}).

4.1.1 Selección de condiciones para la separación de Ácidos Fúlvicos por Electroforesis Capilar

A la fecha existe poca bibliografía acerca del análisis de AF por EC. Comúnmente, los electroferogramas que generan los AF y que se exponen en algunos artículos, no constan de una gran cantidad de señales; ejemplo de ello son los que se muestran en la Figura 7, en la cual es evidente que a pesar de utilizar diferentes condiciones de análisis, los AF no se separan de manera satisfactoria. Además, no todos los electroferogramas que se muestran en los artículos están expresados en tiempo de migración, sino que utilizan escalas de movilidad de las señales ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{min}^{-1}$), por lo cual no es posible comparar a simple vista el perfil de los electroferogramas. Debido a esto fue necesario encontrar un método electroforético a seguir, por lo que se variaron ciertas condiciones, a partir de las cuales se seleccionaron las mejores, es decir, aquellas que permitieran un corto tiempo de análisis, así como la obtención de la mayor cantidad de picos resueltos.

4.1.1.1 Concentración de la muestra

La primera variable bajo estudio fue la concentración de la muestra a analizar, por lo cual se eligió como buffer de partida: ácido bórico 90 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128, esto debido a que en reportes previos se menciona que este buffer permite una separación de AH [71], por tanto se esperaba un efecto similar en el caso de los AF.

Posteriormente se prepararon soluciones de AF estándar 1.0 mM, 0.5 mM y 0.1 mM y se inyectaron al equipo cada una a la vez. En la Figura 11, se aprecia claramente que a mayor concentración de la muestra, mayor es la intensidad de las señales que se generan.

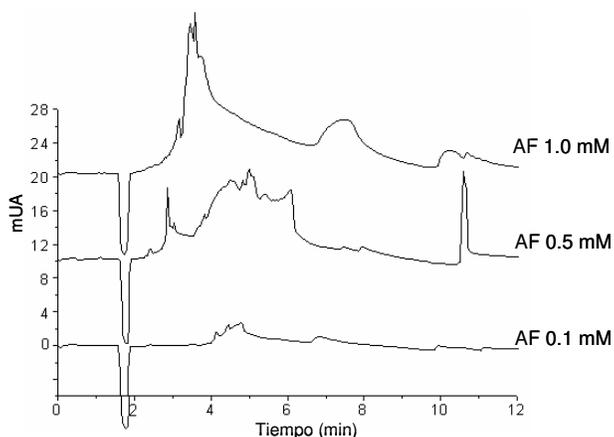


Figura 11. Estudio electroforético de la variación de la concentración de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil, buffer de ácido bórico 90 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM a pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

Al comparar el electroferograma generado por los AF estándar 0.5 mM con el de los AF estándar 0.1 mM, se observa que la intensidad y número de picos es mayor en el correspondiente a los AF estándar de concentración 0.5 mM. Posteriormente, al seguir incrementando la concentración de la muestra hasta 1.0 mM, y comparar el electroferograma resultante con el los AF estándar 0.5 mM, se observa que el perfil de la señal difiere; la explicación a ello podría ser que la relación de moléculas de AF con las de los componentes del buffer difiere, y que al haber un mayor número de moléculas de AF, los componentes del buffer no son suficientes para interactuar y separar a la muestra de la misma manera. Por esta razón se optó por utilizar el AF estándar de concentración 0.5 mM para los subsecuentes experimentos electroforéticos.

4.1.1.2 Concentración del buffer

La concentración del buffer a utilizar es un factor importante, ya que a mayor número de moléculas presentes en el buffer, mayor es la interacción con la muestra de AF estándar. En la Figura 12 se muestra el efecto de esta variable en

los electroferogramas obtenidos. Las concentraciones del buffer se especifican en la Tabla 5.

En la Figura 12 se aprecia que conforme la concentración del buffer disminuye, menor es el tiempo que tarda la muestra en pasar por el detector, lo cual es favorable si se busca minimizar el tiempo de análisis. Sin embargo, este hecho afecta de manera importante la resolución de los picos debido a que mayor número de moléculas de carga y masa similar se mueven juntas, generando una mayor absorbancia en un tiempo muy cercano y, por tanto, que los picos correspondientes a diferentes componentes de la muestra se solapan.

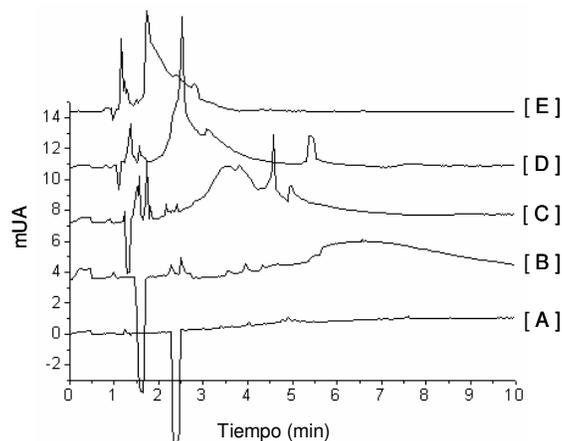


Figura 12. Estudio electroforético de la variación de la concentración del buffer y su efecto en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20^o C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. Composición del buffer A-D en la tabla 5. FEO = Flujo electroosmótico.

Tabla 5. Concentración de los componentes del buffer ácido bórico / TRIS / EDTA utilizados para generar los electroferogramas mostrados en la Figura 12.

Etiqueta	Concentración del buffer
[A]	ác. bórico 270 mM / TRIS 345 mM / EDTA 2.25 mM, pH = 8.169
[B]	ác. bórico 180 mM / TRIS 230 mM / EDTA 1.50 mM, pH = 8.154
[C]	ác. bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128
[D]	ác. bórico 45.0 mM / TRIS 57.5 mM / EDTA 0.38 mM, pH = 8.102
[E]	ác. bórico 22.5 mM / TRIS 28.8 mM / EDTA 0.19 mM, pH = 8.077

En los electroferogramas obtenidos con buffer de concentraciones [A], [B] y [C] de la Figura 12, se aprecia una disminución gradual del tiempo análisis así como un aumento en la altura de los picos y mejores señales de los componentes. Sin embargo, comparando los electroferogramas [C], [D] y [E] puede apreciarse que si bien los picos van incrementando su altura, la resolución disminuye a tal grado que sólo se aprecian 2 picos irregulares que aparecen casi inmediatamente después del flujo electroosmótico (FEO). Tomando en cuenta todo lo anteriormente dicho, no se consideró conveniente seleccionar el buffer ácido bórico / TRIS / EDTA de concentración [E] a pesar de que es el que genera el menor tiempo de análisis. Así, el buffer de concentración [C] (ác. bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128) fue seleccionado para los subsecuentes experimentos.

4.1.1.3 Voltaje de separación

Una vez elegidas las concentraciones de los AF estándar y del buffer a emplear, se procedió a elegir el voltaje de separación (Figura 13). Con la variación de la intensidad del voltaje de separación de la muestra, se genera un efecto similar al ocurrido por la variación de la concentración, sin embargo su origen no es el mismo.

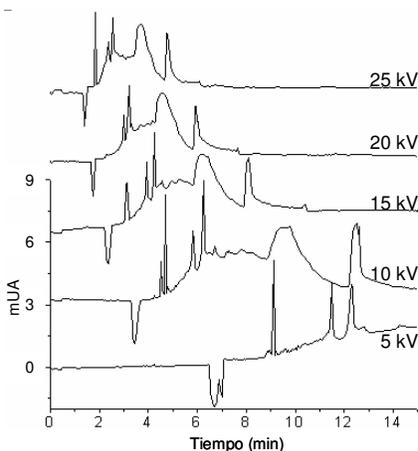


Figura 13. Estudio electroforético del efecto de la variación del voltaje en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 20^o C, λ = 214 nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal.

La Figura 13 muestra que a mayor voltaje aplicado, la separación de la muestra se lleva a cabo en un menor tiempo. Sin embargo, en este caso la señal no pierde intensidad pero los picos se angostan. Este efecto se debe a que, a mayor voltaje aplicado, la velocidad con la que viajan los componentes de la muestra es mayor, y al tardar menos tiempo en pasar cada componente por el detector, el pico registrado tiene una apariencia mas fina.

Para este caso, se eligió como voltaje de separación el de 20 kV, ya que comparativamente el número de señales obtenidas es mejor y el tiempo de análisis no es muy prolongado.

4.1.1.4 Temperatura de separación

El equipo de EC empleado permite variar la temperatura del capilar que se encuentra dentro del cartucho, ya que al conectar el capilar con una solución conductiva en su interior (buffer) y aplicarle una diferencia de potencial elevada (miles de volts), se produce un paso de corriente eléctrica que calienta la solución conductiva y por consiguiente también se calienta la muestra (efecto Joule). Este calentamiento aumenta la conductividad eléctrica de la solución así como la movilidad de las especies ocasionado por la disminución de la viscosidad de la solución [72].

Tomando en cuenta el efecto que produce el incremento de la temperatura en la muestra, ésta se puede manipular para hacer que el método sea más eficiente. En la Figura 14 se aprecia las diferentes movilidades de la muestra según la temperatura utilizada.

De los electroferogramas mostrados en la Figura 14 se eligió la temperatura de 25° C. Esta selección se hizo debido a que la temperatura ambiente promedio es de 25° C aproximadamente, lo que nos mostraría un efecto más real al momento de simular la complejación de AF con metales.

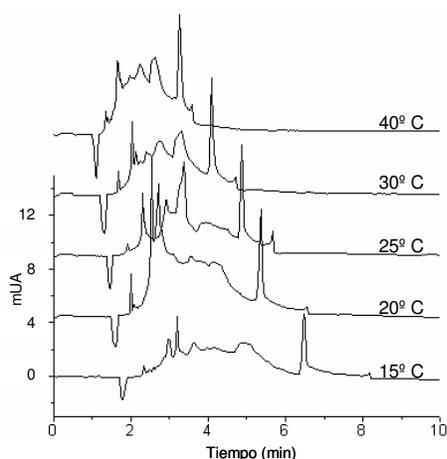


Figura 14. Efecto de la temperatura en la separación electroforética de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, voltaje de separación 20 kV, $\lambda = 214$ nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

4.1.1.5 Polaridad

Cuando se habla del sentido de la polaridad, se hace referencia al sentido que tomará la corriente eléctrica al conectar el capilar lleno de buffer y aplicarle una diferencia de potencial. Así, la dirección de la corriente eléctrica se puede invertir mediante el cambio de la polaridad que tienen los electrodos (ánodo y cátodo) del equipo. Este cambio se realiza cuando el tiempo de migración de las especies de interés es muy prolongado porque las partículas tienen la misma carga del electrodo de salida.

En este trabajo, cuando se habla de polaridad normal se hace referencia a que el cátodo se encuentra en el mismo vial que el extremo de entrada del capilar, por lo que el ánodo se encuentra en el vial del extremo de salida del capilar.

Es decir, cuando se habla de polaridad normal, se considera que las primeras especies en migrar serán aquellas con carga positiva, y al invertir la

dirección de la polaridad las primeras especies en migrar serían aquellas con carga negativa, por lo que, el cambio de la polaridad en EC permitiría en principio observar las especies que en polaridad normal tomarían tiempo muy largo en pasar por el detector. Por esta razón es necesario invertir el sentido de la polaridad de los electrodos y corroborar que no se observa un número mayor de señales al realizarlo (Figura 15).

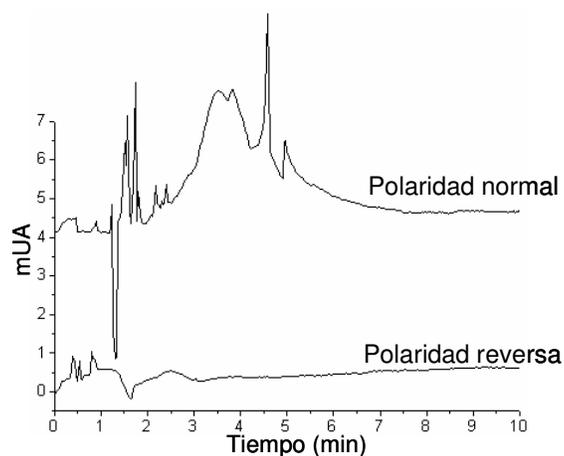


Figura 15. Efecto del sentido de la polaridad en la separación electroforética de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida. FEO = Flujo electroosmótico.

4.1.1.6 Inyección de la muestra

La variación de la inyección de la muestra, tanto en tiempo como en presión es un factor que afecta la calidad de las señales. Ejemplo del efecto que genera el cambio de presión es el mostrado en la Figura 16, donde se puede ver que al modificar la presión de inyección de la muestra, y manteniendo el mismo tiempo de inyección, las señales que se generan son sumamente diferentes en su intensidad.

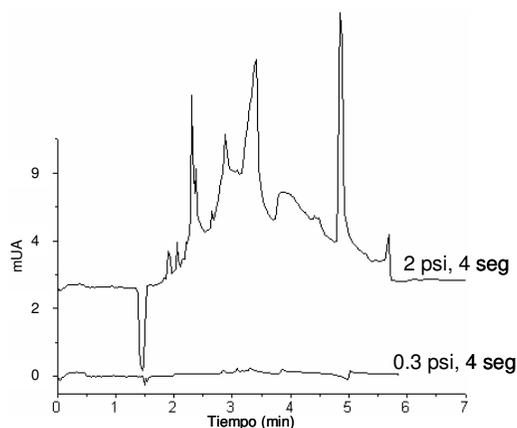


Figura 16. Estudio electroforético del efecto de la variación en la inyección de la muestra en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

A partir de la comparación de la Figura 16, se decidió continuar utilizando la inyección de la muestra de AF de forma hidrodinámica (presión) a 2 psi durante 4 segundos, tal y como se hizo en todos los experimentos realizados anteriormente.

4.1.1.7 Señal correspondiente al buffer

Hasta este punto se había seleccionado la mejor concentración de los AF estándar a utilizar, la concentración del buffer, el voltaje de separación a aplicar, la temperatura del capilar, el sentido de la polaridad y el tiempo de inyección de la muestra. Sin embargo era necesario comprobar que las señales en los electroferogramas correspondían a los AF en estudio y no del buffer *per se*. Con este fin, y considerando las condiciones encontradas hasta el momento se realizó un experimento en donde, en lugar de inyectar la muestra de AF, se inyectó la misma cantidad de buffer. La Figura 17 muestra el resultado de ésta separación.

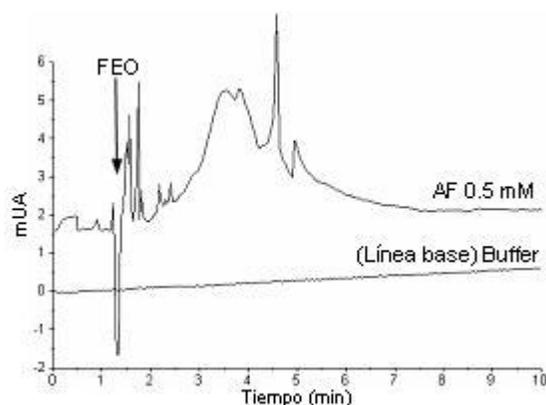


Figura 17. Comparación de las señales producidas por el buffer de corrida y el AF en estudio. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128 ; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electrosmótico.

La Figura 17 muestra que el buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA no genera señales que pudieran confundirse con las de los AF a analizar.

4.1.1.8 Efecto de la naturaleza del buffer en la separación

Con la finalidad de comparar los resultados obtenidos hasta el momento en cuanto a la separación de los AF, y dado que en la bibliografía consultada no se muestran los electroferogramas que se obtienen al utilizar diferentes soluciones amortiguadoras, se realizaron diferentes experimentos evaluando el efecto que tienen la composición y naturaleza de diferentes buffers en la separación de los AF.

Para tal fin, se prepararon buffers de diferente composición de acuerdo a las propuestas hechas por diversos autores [40-44], con los cuales se trató de separar las muestras de AF estándar bajo las condiciones óptimas encontradas anteriormente (20 kV, 25° C e inyección de la muestra de forma hidrodinámica a 2 psi durante 4 seg). Los electroferogramas obtenidos (polaridad normal y reversa) con dichos buffers se muestran en la Figura 18.

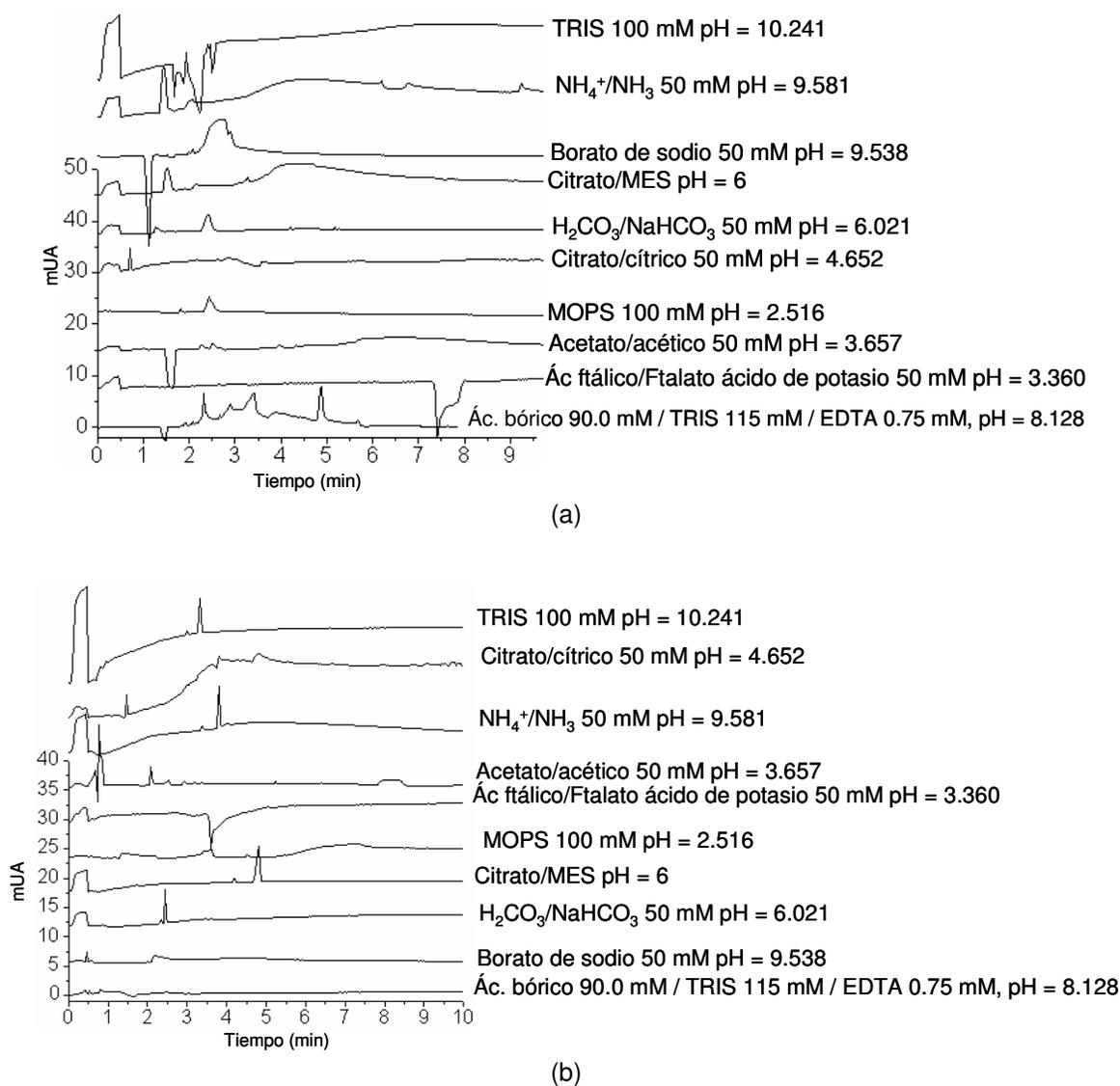


Figura 18. Estudio electroforético de la variación de la composición del buffer de corrida y su efecto en la separación de AF. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida. (a) polaridad normal y (b) polaridad reversa.

Al comparar el electroferograma obtenido con el buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA con los generados con otros buffers (Figura 18), no se observa ninguna mejora en cuanto al número de señales presentes. Debido a esto, se eligieron como mejores condiciones del método de separación las siguientes: AF estándar 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM,

pH = 8.128, 20 kV, polaridad normal, 25° C e inyección de la muestra de forma hidrodinámica a 2 psi durante 4 segundos.

Una vez halladas las condiciones óptimas del método de separación se realizaron estudios de repetitividad, encontrándose que, si bien los electroferogramas obtenidos en un mismo día (día 137) son similares entre sí, los obtenidos en diferentes días presentan variaciones significativas a pesar de que se utilizó la misma solución de AF estándar (Figura 19).

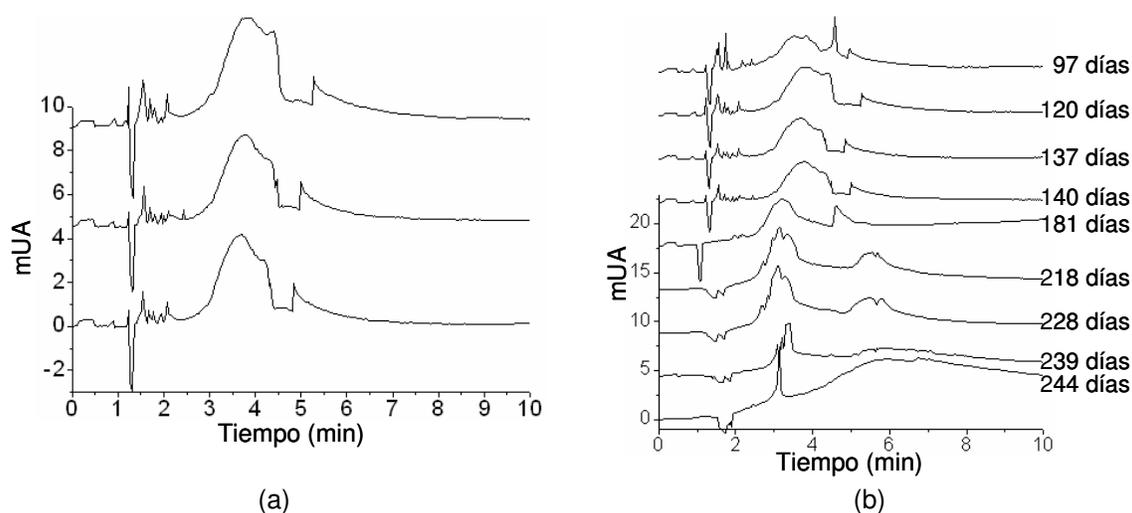


Figura 19. Electroferogramas de AF obtenidos (a) en un mismo día y (b) en días diferentes. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electrosmótico.

En los electroferogramas de la Figura 19 (b) se observan las diferencias entre el comportamiento del sistema de AF en días diferentes, donde se aprecia además que con el paso de los días el número de señales disminuye hasta el punto en que sólo se aprecian 2 señales poco definidas y asimétricas.

Hasta ese momento se pensaba que el problema referente a la falta de reproducibilidad de los electroferogramas radicaba únicamente en el tiempo que

llevaba preparada la solución de buffer, por lo que se optó por prepararla y emplearlas el mismo día, sin embargo no se observó ninguna mejoría.

4.1.1.9 Estudio de la estabilización de los Ácidos Fúlvicos

4.1.1.9.1 Estudio de la estabilización por medios físicos y químicos

Una vez comprobado que la falta de reproducibilidad no era consecuencia de las soluciones buffer empleadas, se consideró el hecho de que el problema radicara en la estabilidad de los AF en agua, medio elegido para simular las condiciones reales en las que se llevan a cabo los procesos de complejación de metales en la naturaleza. La solución a seguir fue la de estabilizar los AF y evitar con ello que las señales obtenidas continuaran cambiando en el tiempo.

Como primera alternativa, se pensó que la modificación de las señales de los AF era generada por la actividad biológica aerobia que generan algunos organismos en las SH, misma que, de acuerdo a la literatura se detiene con la adición de azida de sodio (NaN_3) [73-74]. De esta forma, se preparó una solución de AF estándar 0.5 mM / NaN_3 1.5 mM en agua, y otra solución cuya composición solo era NaN_3 1.5 mM en agua. Para estos experimentos se siguió utilizando el buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, dando como resultado los electroferogramas que se muestran en la Figura 20 (a).

Sin embargo, el uso de NaN_3 en la solución de AF estándar no conllevó ningún beneficio ya que las señales generadas no mejoraron en comparación a las que se obtuvieron sin azida (Figura 20 (a)), además de que continuaban presentándose problemas de reproducibilidad (Figura 20 (b)). Esta diferencia indica que el cambio en la forma de las señales que generan los AF no son debidas a acción microbiana, sino a la inestabilidad de la compleja estructura que poseen los AF.

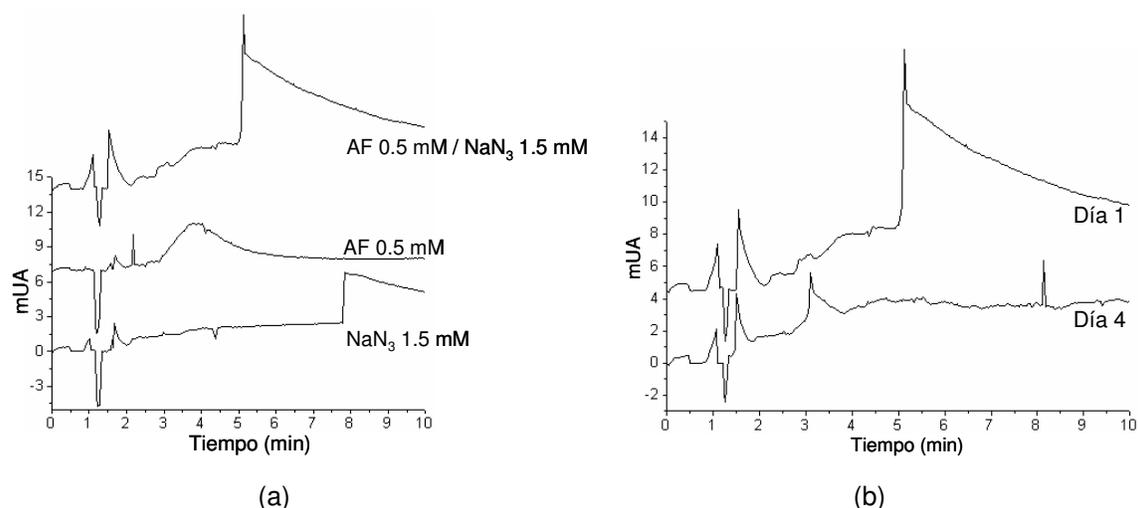


Figura 20. Efecto de la adición de azida en la estabilización de AF. (a) Electroferogramas generados por la solución de AF- NaN_3 , AF y NaN_3 . (b) Separación de los AF 0.5 mM / NaN_3 1.5 mM el día en que fue preparada la solución y 3 días después. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM con NaN_3 , buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

Se siguieron dos procedimientos más para lograr la estabilización: la primera opción fue el calentamiento de la muestra de AF en baño María durante 30 minutos y la segunda fue ultrasonicar la muestra durante 30 minutos, con la finalidad de acelerar el reacomodo y/o separación de las moléculas que conforman los AF.

En la Figura 21 se muestran los electroferogramas resultantes; en estos experimentos la separación de los AF estándar se realizó con el buffer de ácido bórico 90. mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM.

En la Figura 21 se puede apreciar que con ninguno de los procedimientos anteriores mejoraron las señales.

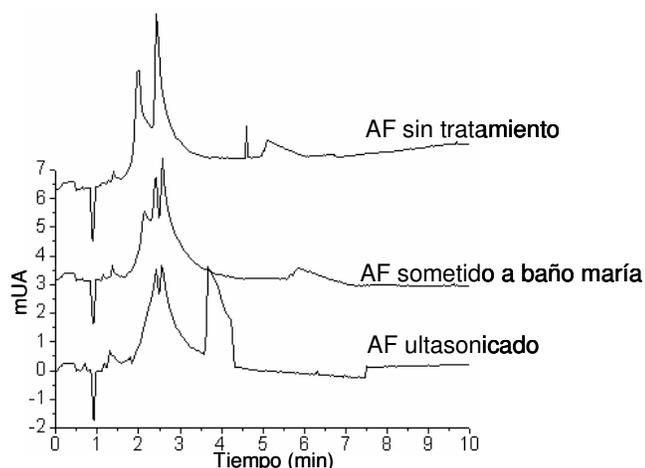


Figura 21. Electroferograma de AF sometido a diversos tratamientos físicos. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal, inyección de la muestra de forma hidrodinámica a 2 psi durante 4 segundos. FEO = Flujo electroosmótico.

4.1.1.9.2 Estudio de la estabilización por incorporación de aditivos

Con el fin de estabilizar las soluciones de AF se realizaron experimentos en donde se modificó el buffer con tensoactivos (aniónicos, catiónicos y no iónicos), que permitieran separar los componentes de los AF. En uno de los experimentos, se utilizaron los AF estándar disueltos en agua, tal y como se había estado haciendo; y en otro experimento la solución de AF estándar se preparó disolviendo la cantidad necesaria de AF estándar en el buffer usado hasta el momento (ácido bórico 22.5 mM / TRIS 28.8 mM / EDTA 0.19 mM), esperando que los AF interaccionaran con los componentes del buffer desde antes de introducir la muestra al capilar y generar con ello una mejor separación.

Para modificar el buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115.0 mM / EDTA 0.75 mM con micelas aniónicas, se adicionó el dodecil sulfato de sodio (SDS) necesario para tener una concentración de 10 mM, la cual es superior a la concentración micelar crítica (CMC =8.2 mM). Este exceso de tensoactivo se

adicionó para tener la seguridad de que se formarían las micelas que atraparían en su interior las fracciones hidrofóbicas de los AF. El uso de micelas sirve para separar los componentes no iónicos de una muestra, los cuales migran con el FEO. Así, en este caso se esperaba lograr la separación de algunos de los componentes de los AF debido a la interacción de las cadenas alifáticas de los AF con las cadenas alifáticas de las micelas de SDS.

Los resultados de este experimento se muestran en la Figura 22, donde puede apreciarse que no hubo mejora alguna con respecto a las condiciones originales. Si bien los dos electroferogramas se obtuvieron usando el buffer modificado con SDS, la diferencia entre ellos radica en el medio en el que se disolvieron los AF: en el marcado como (A) la muestra de AF se disolvió en el buffer con SDS con el objeto de que los componentes del buffer interaccionaran con las moléculas de AF desde el momento en que estaban en solución; en cambio, el electroferograma (B) es el resultado del experimento en el que los AF fueron disueltos únicamente en agua.

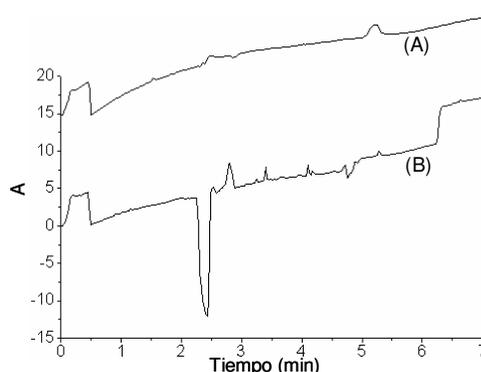


Figura 22. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con SDS. (A) AF disueltos en buffer, (B) AF disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + SDS 10 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

Por otro lado, la acción de un tensoactivo catiónico como el bromuro de trimetil cetil amonio (CTAB) es, inicialmente, la de formar una capa que recubre al capilar ya que unas moléculas de CTAB se adhieren a las paredes debido a interacciones iónicas entre sus cargas positivas y las cargas negativas del capilar. Posteriormente, las moléculas de CTAB que no interaccionaron con el capilar y que se encuentran libres en la solución, interaccionan con las moléculas de AF. Para modificar el buffer con este tensoactivo se consideró que la CMC del CTAB es de 1.3 mM, por lo que se agregó la cantidad necesaria para tener dicha concentración. En la Figura 23 se muestran nuevamente dos electroferogramas, donde una vez más, el etiquetado como A es el que se obtuvo con los AF estándar disueltos en buffer, y el etiquetado como B es el que se obtuvo con los AF estándar disueltos en agua.

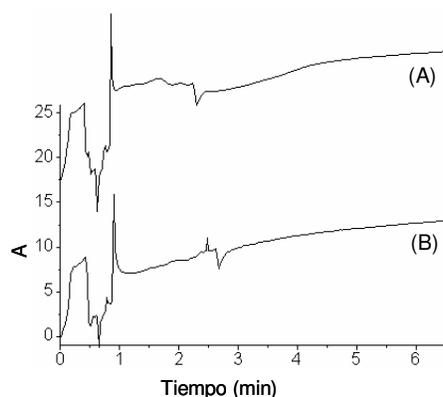


Figura 23. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con CTAB. (A) AF estándar disueltos en buffer, (B) AF estándar disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + CTAB 1.3 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

Finalmente se hizo la modificación del buffer con polietilen sorbitan a una concentración 0.24 mM (TWEEN 20, CMC = 0.24 mM) el cual es un tensoactivo no iónico que interacciona de forma hidrofóbica con las especies presentes en la muestra. Los electroferogramas resultantes se muestran en la Figura 24. Tampoco en este caso se obtuvo una mejora de la separación.

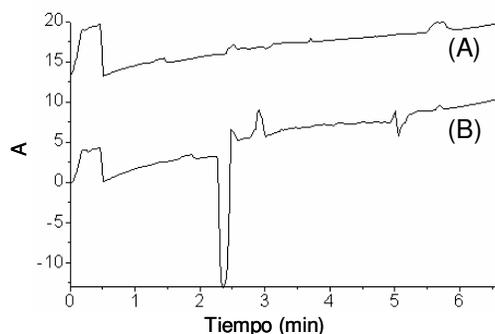


Figura 24. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con TWEEN. (A)

AF estándar disueltos en buffer, (B) AF estándar disueltos en agua. Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + TWEEN 0.24 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

En las Figuras 22, 23 y 24 se muestra que la adición de modificadores del buffer no proporcionó una mejor separación que la obtenida con el buffer de ácido bórico 22.5 mM / TRIS 28.8 mM / EDTA 0.19 mM

Otra modificación del buffer fue hecha con la adición de β -ciclodextrinas (β -CDs), sustancias comúnmente utilizadas para la separación de mezclas racémicas de compuestos enantioméricos. Se sabe que la combinación de β -CDs con boratos es una herramienta útil para la separación de compuestos quirales que contienen dioles vecinales [75] como pudiera ocurrir en el caso de los AF. Sin embargo, el resultado que se muestra en la Figura 25, no arroja mejoras en la separación de los AF.

Así, aunque en el electroferograma de la Figura 25 se aprecia una cierta separación de los AF se puede ver que la línea base va subiendo rápidamente, lo que indica la posibilidad de que los AF se adhieren excesivamente con las paredes del capilar, generando una mayor absorbancia, por lo que no se contaría con electroferogramas confiables.

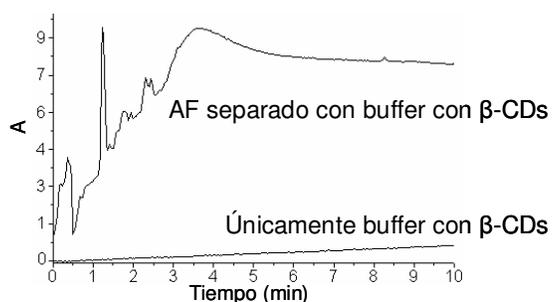


Figura 25. Electroferogramas de AF obtenidos empleando un buffer modificado con β -CDs.

Condiciones: AF estándar Elliott Soil 0.5 mM, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM + β -CDs 10 mM; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, $\lambda = 214$ nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal.

Con base en los resultados anteriores, se decidió que las mejores condiciones para el seguimiento de la señal de los AF estándar y su interacción con iones metálicos, serían las siguientes: detector de UV a una longitud de onda de 214 nm, temperatura del capilar a 25 °C, voltaje de 20 kV durante 10 minutos, inyección de forma hidrodinámica (presión) durante 4 segundos a 2 psi, buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115.0 mM / EDTA 0.75 mM con pH =8.128. Sin embargo, es importante resaltar que, debido a los problemas de estabilidad, se optó por realizar todos los experimentos del monitoreo de la interacción AF-metal en el menor tiempo posible para obtener resultados que pudieran compararse con seguridad.

4.1.2 Estudio de la interacción Ácidos Fúlvicos – metal.

Una vez estudiadas las condiciones para la separación de AF estándar, y con el conocimiento de los electroferogramas para los AF estándar, se procedió a la obtención de electroferogramas de soluciones de AF a las que se añadían diferentes cantidades de iones metálicos. Así, las diferencias entre ambas clases de electroferogramas proporcionarían información acerca de la interacción entre ambas especies químicas.

4.1.2.1 Procedimiento

Inicialmente se colocaron en un vial 150 μL de AF estándar 0.5 mM, a los cuales se les adicionó pequeños volúmenes de M^{2+} 1.25 mM (10 μL); entre cada adición se obtuvieron los electroferogramas correspondientes. Este procedimiento se realizó de manera cíclica hasta llegar a las relaciones estequiométricas por arriba y por debajo de la relación 1:1 AF:metal (Tabla 6). En la Figura 26 se muestra el procedimiento descrito.

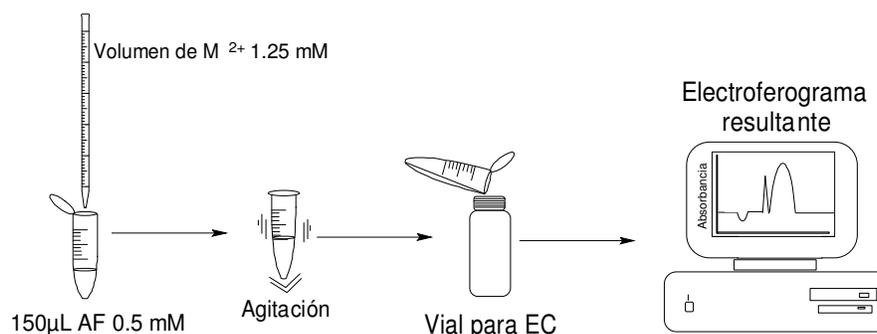


Figura 26. Descripción gráfica del procedimiento para el seguimiento por EC de la variación de la señal de los AF por la adición de metal.

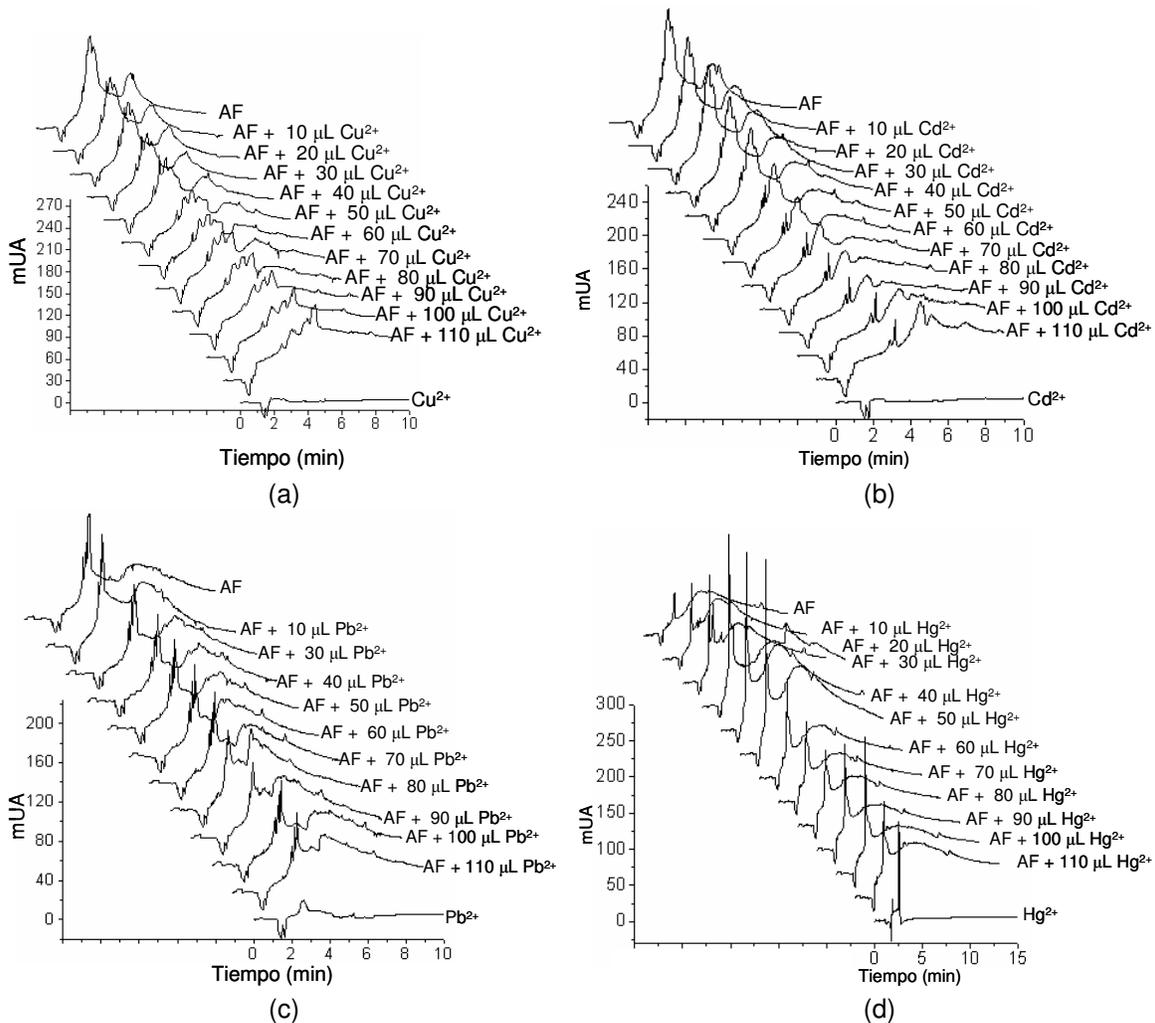
Tabla 6. Variación de las concentraciones de M^{2+} y de los AF durante el seguimiento de la señal de los AF estándar Elliott Soil.

μL de M^{2+} adicionados	$[\text{M}^{2+}]$	[AF]
0	-	0.5000 mM
10	0.0781 mM	0.4690 mM
20	0.1380 mM	0.4411 mM
30	0.2083 mM	0.4160 mM
40	0.2632 mM	0.3947 mM
50	0.3125 mM	0.3750 mM
60	0.3571 mM	0.3571 mM
70	0.3977 mM	0.3409 mM
80	0.4347 mM	0.3260 mM
90	0.4687 mM	0.3125 mM
100	0.5000 mM	0.3000 mM
110	0.5288 mM	0.2885 mM

4.1.2.2 Resultados y discusión

En los electroferogramas de la Figura 27 se pueden apreciar los cambios que sufren las señales de los AF estándar después de que se van haciendo adiciones del metal de concentración 1.25 mM.

En la figura 27 se muestran una serie de electroferogramas de las soluciones de AF estándar con metal. El primer y el último electroferograma (de arriba hacia abajo) corresponde a los AF sin complejar, mientras que el último es del metal libre.



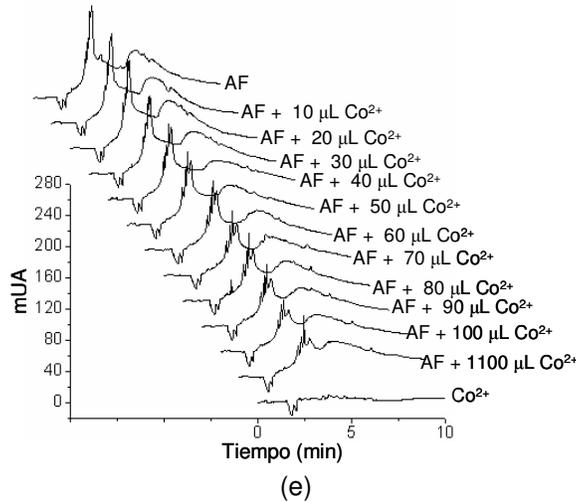
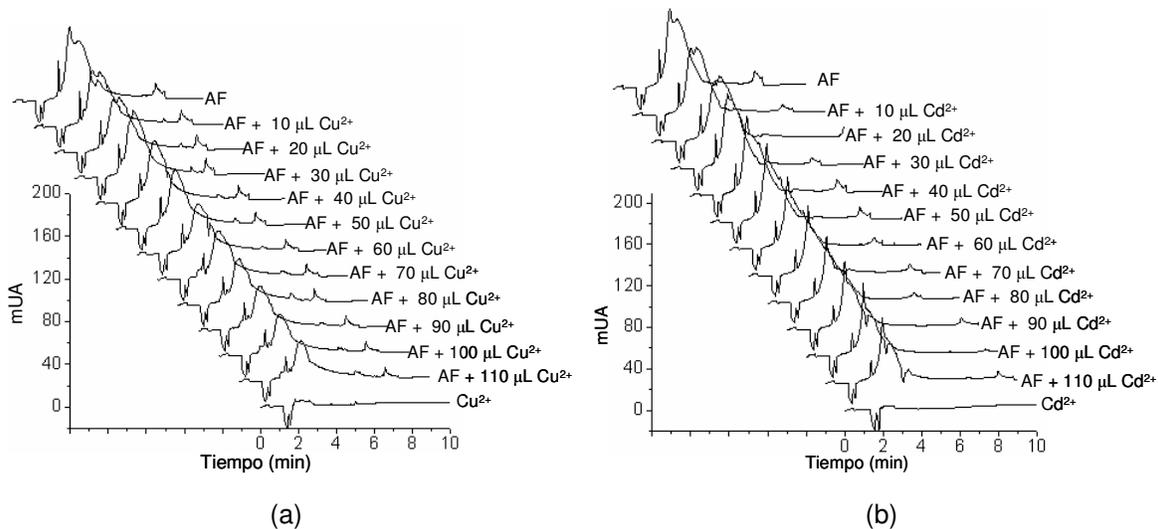


Figura 27. Estudio electroforético de la interacción del AF estándar Elliott Soil con diversos iones metálicos. (a) AF-Cu²⁺, (b) AF-Cd²⁺, (c) AF-Pb²⁺, (d) AF-Hg²⁺ y (e) AF-Co²⁺. Condiciones: Buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25° C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

También se llevó a cabo el monitoreo de la señal de los AF extraídos del suelo de Tulancingo, así como su variación mediante la adición de iones metálicos (Figura 28).



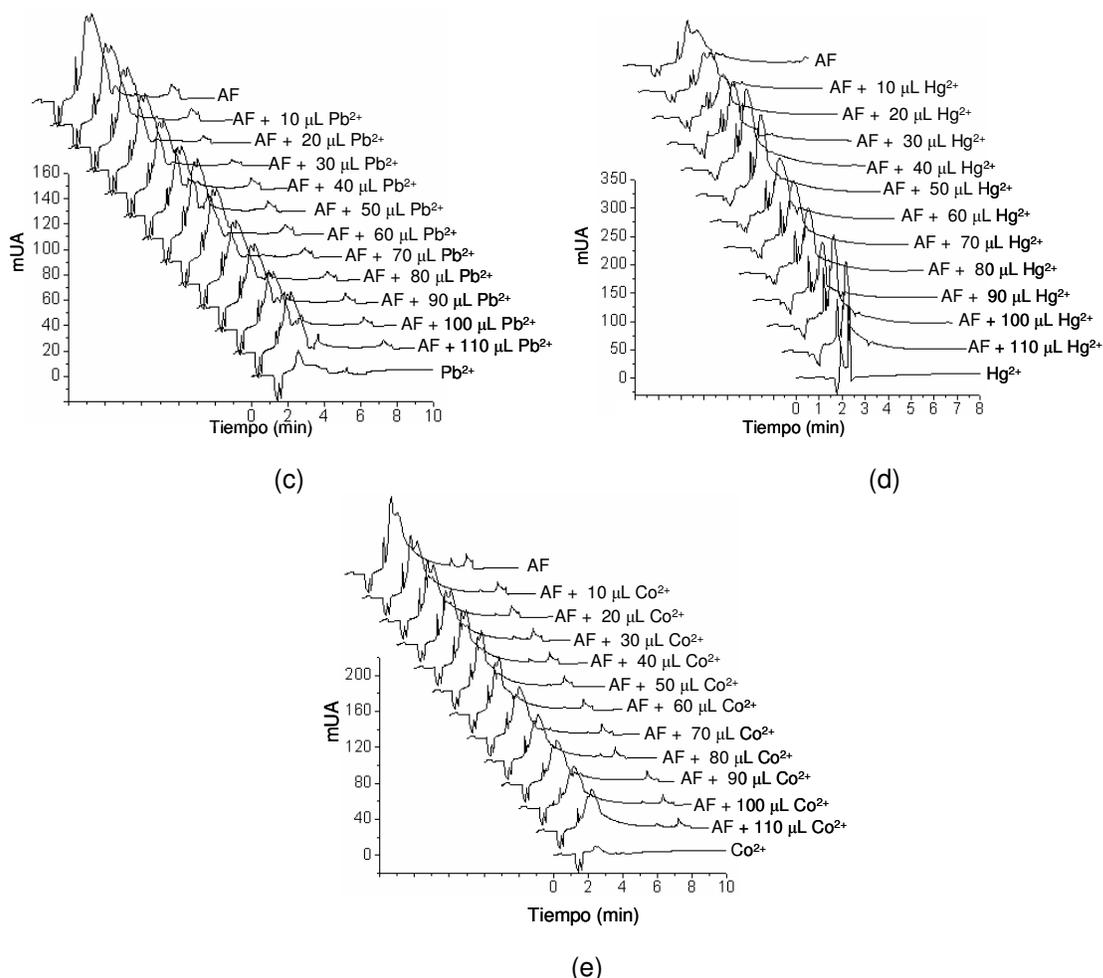


Figura 28. Estudio electroforético de la interacción del AF de Tulancingo con diversos iones metálicos. (a) AF- Cu^{2+} , (b) AF- Cd^{2+} , (c) AF- Pb^{2+} , (d) AF- Hg^{2+} y (e) AF- Co^{2+} . Condiciones: Buffer de ácido bórico 90.0 mM / TRIS 115 mM / EDTA 0.75 mM, pH = 8.128; inyección hidrodinámica 4 seg, presión 2 psi, 25^o C, λ = 214 nm, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

En las Figuras 27 y 28 se aprecia que cada una de las familias de electroferogramas es diferente de la otra, lo que nos indica que la complejación e interacción entre los grupos de los AF con los iones metálicos es diferente en cada una de ellas. Sin embargo, debido a que no se pudieron obtener mejores señales, en donde los picos fueran bien definidos y simétricos, es difícil hacer una correlación de área² o altura de pico vs concentración. De esta forma, se concluye que por este procedimiento no fue posible obtener información cuantitativa acerca

de la interacción de los AF con el metal, sino simplemente cualitativa, al observar que los electroferogramas de los AF sufren modificaciones de manera diferente al interaccionar con diferentes metales. Por lo que, con la finalidad de poder comparar de manera mas tangible la diferencia existente durante la interacción AF-metal, se planteó el procedimiento contrario, es decir, el análisis de la señal del metal y su alteración debido a la adición de AF.

4.2 Seguimiento de la señal del metal y su alteración debido a la adición de Ácidos Fúlvicos.

4.2.1 Método para el seguimiento de metales.

Para llevar a cabo el seguimiento de la señal de cada uno de los metales utilizados, fue necesario seleccionar un buffer con el cual las especies metálicas estuvieran libres (sin formar hidroxocomplejos), así como conocer las condiciones adecuadas para realizar el análisis. Así que aprovechando que ya se han realizado experimentos por EC para el seguimiento de iones metálicos [76], se tomó como base el uso de algunos buffers; sin embargo, se corroboró que fueran los adecuados.

4.2.1.1 Elección del buffer para los experimentos por Electroforesis Capilar.

Para el monitoreo de la señal del metal fue necesario seleccionar un buffer que no interaccionara con la materia orgánica, con la finalidad de que ésta estuviera disponible para la interacción con el metal. De acuerdo a lo reportado en la literatura tanto el buffer de acetatos como el de carbonatos cumplen este requisito [42], por lo cual se seleccionó un buffer de acetatos 50 mM a pH = 3.5 para realizar los experimentos. De igual forma y con ayuda de Diagramas de Distribución de Especies (DDE) para los sistemas M^{2+} /acetatos/agua (Figura 29), se investigó si bajo las condiciones de trabajo los iones metálicos se encontrarían libres o formando complejos con los iones acetato presentes en el buffer.

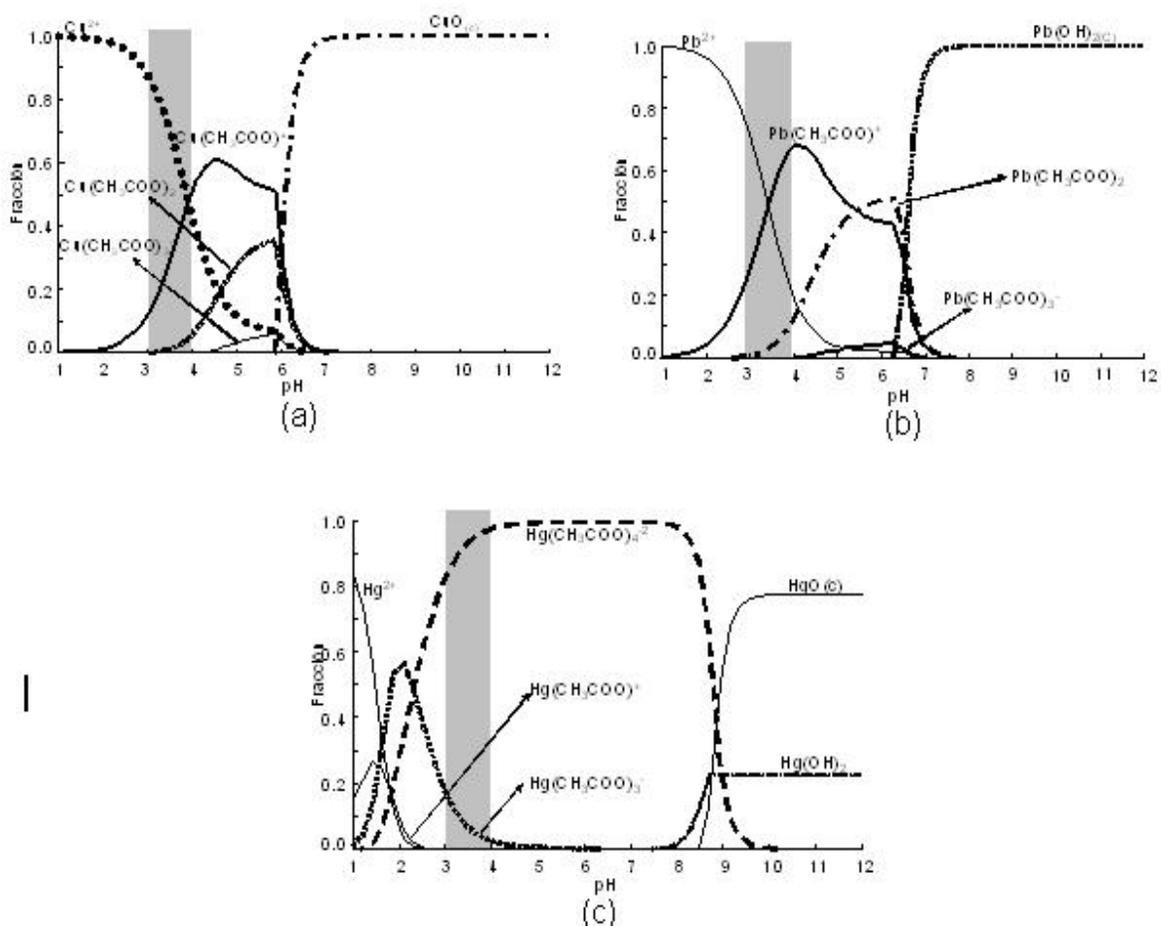


Figura 29. DDE's para los diferentes sistemas M^{2+} /acetatos/agua. (a) Cu^{2+} , (b) Pb^{2+} y (c) Hg^{2+} . $[Ac^-]=50$ mM.

En los diagramas anteriores se aprecia que los iones metálicos se encuentran predominantemente en su forma libre (como M^{2+}) a valores de pH cercanos a 3.5, con excepción del mercurio. Sin embargo, a pesar que el catión Hg^{2+} se encuentra como tal sólo a valores de pH menores de 1.5, se optó por utilizar el buffer de acetatos de pH 3.5, con la finalidad de trabajar en un pH lo más cercano posible al que podría tener en suelo real, el cual oscila entre 4 y 8 [77-78].

4.2.2 Estudio de la interacción del Ácidos Fúlvicos - metal

Empleando el buffer de acetatos 50 mM, se obtuvieron una serie de electroferogramas de soluciones del ión metálico a las que se añadieron diferentes

cantidades de AF. Así, las diferencias entre ambas clases de electroferogramas proporcionaron información acerca de la interacción entre ambas especies químicas.

4.2.2.1 Procedimiento

En un vial que contenía 500 μL del ion metálico M^{2+} a una concentración 0.01M, se adicionaron volúmenes de 50 μL de AF 0.01M; entre cada adición se agitó y se hizo una lectura de la señal. La operación se realizó consecutivamente con la finalidad de lograr variaciones estequiométricas por arriba y por debajo de la relación 1:1 metal:AF. Tomando en cuenta que la concentración de los AF y de cada uno de los metales es 0.01 M y que inicialmente se contaban con 500 μL de metal, se deduce que la relación equimolar se logra adicionando una cantidad igual de AF, es decir 500 μL . En la Figura 30 se muestra esquemáticamente el procedimiento descrito.

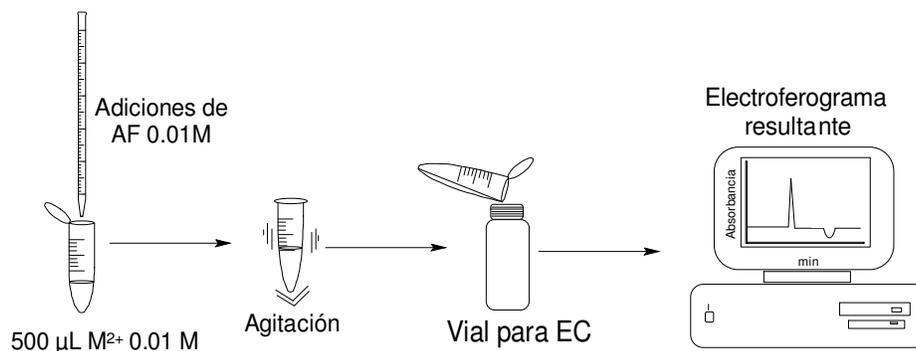
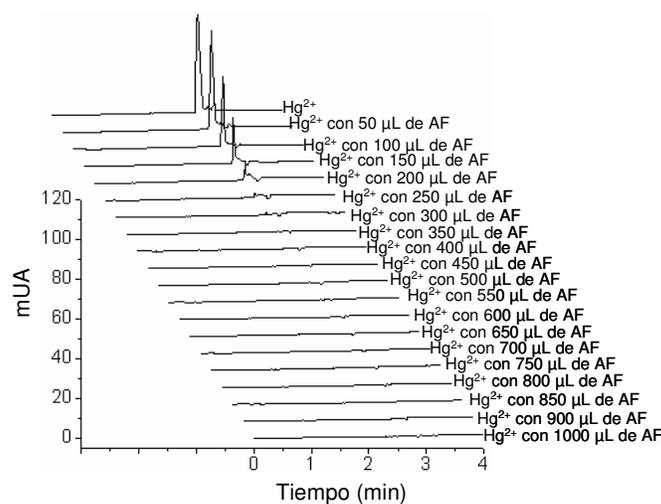


Figura 30. Descripción gráfica del procedimiento para el seguimiento por EC de la variación de la señal del metal por la adición de AF.

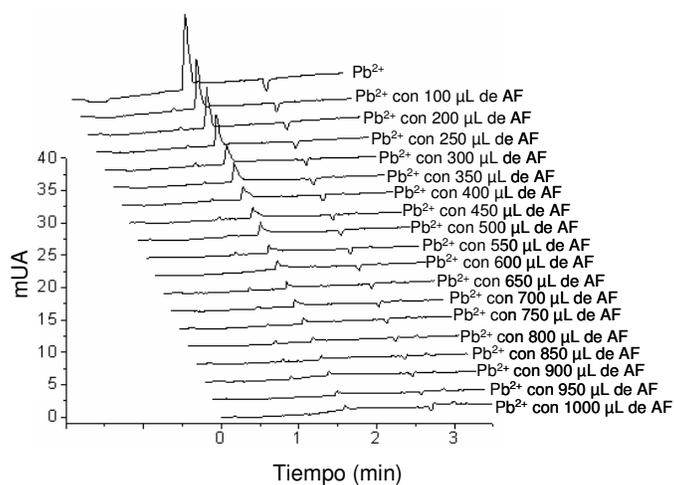
La condiciones a las cuales se realizó el análisis por EC fueron las siguientes: detector UV ($\lambda = 214$ nm), T capilar = 25 $^{\circ}\text{C}$, V = 20 kV, t = 10 min; inyección de la muestra (M^{2+}) de forma hidrodinámica (presión) durante 5 seg a 0.3 psi; buffer de acetatos 50 mM con pH = 3.5.

4.2.2.2 Resultados y discusión

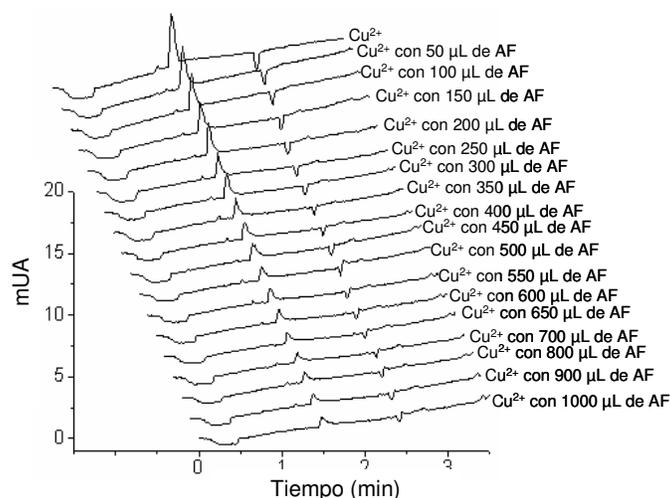
En la Figura 31 se muestra la disminución consecutiva de las señales de cada uno de los metales al ir adicionando AF estándar. Sin embargo, cabe destacar que la disminución de las señales no es igual para todos los casos, lo que indica que existe cierta selectividad de complejación AF-M²⁺, es decir, que existe mayor afinidad por algunos metales que por otros.



(a)



(b)



(c)

Figura 31. Estudio electroforético de la interacción Ion metálico-AF estándar Elliott Soil. (a) Hg^{2+} -AF, (b) Pb^{2+} -AF y (c) Cu^{2+} -AF. Condiciones: Buffer de acetatos 50 mM a pH = 3.5, inyección hidrodinámica de la muestra (M^{2+}) 5 seg, presión 0.3 psi, 25° C, voltaje de separación 20 kV ; $\lambda = 214$ nm, capilar de sílice fundida, polaridad normal. FEO = Flujo electroosmótico.

La disminución de tamaño de las señales de los metales por la adición de AF es evidente en cada familia de electroferogramas; sin embargo, para poder apreciar y comparar mejor esta disminución, se realizó una gráfica (Figura 32) que relaciona la Altura de pico* vs la concentración de los metales en cada experimento. Es importante mencionar que para la Altura de pico* se hizo un ajuste en las unidades en las que se expresa para poder reunir las tendencias en una sola gráfica, ya que a pesar de que la concentración mM es la misma para los tres metales, la absorbancia de cada uno de ellos no es la misma. En este ajuste se procuró mantener la proporcionalidad entre las alturas de pico de cada familia, suponiendo como el 100% la altura del pico de mayor tamaño.

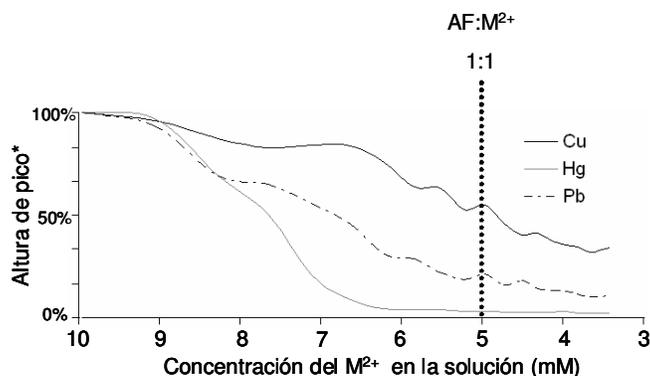


Figura 32. Variación de la altura de pico con respecto a la concentración del metal en los estudios electroforéticos de la interacción ión metálico-AF.

En la Figura 32 se puede apreciar claramente que la señal del Hg²⁺ desaparece casi por completo aún antes de llegar a la relación equimolar AF:M²⁺. Una razón por la que esta señal desaparece casi de manera inmediata podría ser que desde el principio, el mercurio se encontrara como complejo, en su mayoría como Hg(CH₃COO)₄²⁻ y un poco como Hg(CH₃COO)₃⁻, es decir, que la señal que se aprecia corresponde a esos dos complejos, y que al interaccionar con los AF, el tipo de complejo que se forma sea AF-acetatos-Hg y no AF-Hg, generando con ello la disminución inmediata de la señal por la neutralización de cargas de los complejos con las moléculas de AF.

En la misma figura se observa que la disminución de la altura de los picos de las familias de los metales Cu²⁺ y Pb²⁺ no es lineal; además, a pesar de sobrepasar la relación equimolar AF:M²⁺ sigue apareciendo la señal del metal, lo que indica que aún existe Cu²⁺ y Pb²⁺ libre en la solución.

A partir de los experimentos realizados, podemos concluir que la interacción que se genera en un sistema donde están presentes tanto AF como diferentes iones metálicos no ocurre de la misma manera para cada uno de ellos, ya que tanto los electroferogramas correspondientes a los AF como a los iones, no se ven alterados por igual. Así, los electroferogramas de los AF se ven modificados en

diferentes partes de la curvatura de sus picos al adicionarles metal, éstos picos anchos y poco definidos podrían ser el reflejo de estructuras moleculares sumamente compactas que a pesar que no se logran separar dentro del capilar, si poseen diferentes sitios por los cuales pueden interaccionar de diferente manera con cada metal dependiendo de la afinidad que tengan con él.

Un aspecto importante a resaltar de la figura 32, es el hecho de que las curvas que muestran la disminución de la altura de pico se quiebra en diversos puntos, lo que podría corresponder a la saturación de diferentes sitios en las moléculas de AF, así como los diferentes tipos de complejos que se formen dependiendo el agente complejante (monodentado o bidentado).

5. ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE DE LA INTERACCIÓN ÁCIDOS FÚLVICOS - METAL

5. ESTUDIO POR ESPECTROSCOPIA ULTRAVIOLETA/VISIBLE DE LA INTERACCIÓN ÁCIDOS FÚLVICOS - METAL

La absorción de radiación en la región UV/Vis del espectro electromagnético es el resultado de las transiciones electrónicas desde un estado basal a un estado excitado de los electrones. Los límites de longitud de onda de estas regiones son de ~200 a ~400 nm para el UV, y de ~400 a ~800 nm para la región visible. En moléculas orgánicas, como son los AF, las transiciones electrónicas generadas por bajas energías se asocian con la presencia de cromóforos, por ejemplo, grupos funcionales que contengan enlaces dobles conjugados y azufre, nitrógeno o átomos de oxígeno con pares de orbitales deslocalizados. En cambio, las bandas de absorción mayores se encuentran asociadas a transiciones electrónicas de electrones de orbitales de enlace hacia orbitales de antienlace de uno o dos pares de electrones.

Los espectros de UV/Vis de los AH y de los AF comúnmente no muestran información relevante, ya que no presentan un máximo o mínimo bien definido, y solo coinciden en que en la mayoría de éstos espectros, la absortividad incrementa a medida que la longitud de onda disminuye. A pesar de esto, se sabe que las SH generan un leve máximo entre 200 y 300 nm en la región UV, especialmente para los AF [79].

5.1 Equipo y condiciones de estudio

Para estimar el valor de las constantes de complejación AF-metal, se llevaron a cabo experimentos espectroscópicos que consistieron en valoraciones de soluciones de los diferentes metales con una solución de AF. Dichos experimentos fueron llevados a cabo en un espectrofotómetro UV/Vis Perkin Elmer Modelo Lambda 40. Las valoraciones se llevaron a cabo de la siguiente manera: en un vaso de precipitados se colocaron 3 mL de soluciones de cada uno de los metales (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} respectivamente) en una concentración

5×10^{-5} M; posteriormente, se adicionaron diversos volúmenes de AF 0.001 M y se obtuvieron espectros a cada adición y a las soluciones iniciales de los iones metálicos. El procedimiento general se esquematiza en la Figura 33.

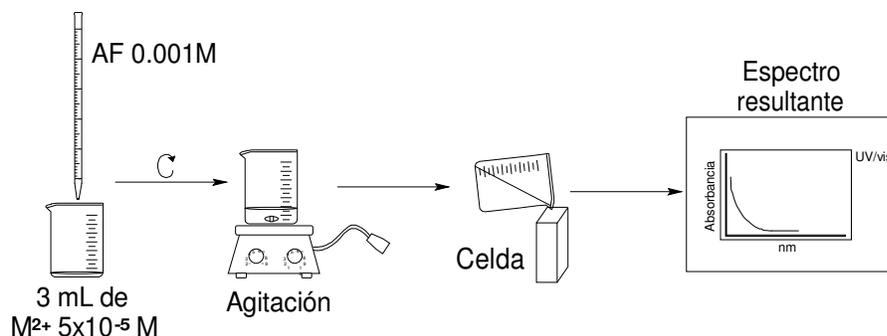


Figura 33. Esquema del procedimiento experimental de las valoraciones espectrofotométricas.

Como se puede apreciar, el procedimiento llevado a cabo comprende una metodología similar a la propuesta para el estudio por EC, con la diferencia que en este caso no es necesario encontrar las condiciones óptimas del método, ya que únicamente se mezclan las soluciones de AF y de metal y se mide el espectro resultante.

5.1.1 Estimación de las constantes de complejación con el programa computacional SQUAD

A partir de las familias de espectros UV/Vis, se analizaron las variaciones de absorbancia generadas y se calculó con ellas la fuerza de interacción AF-metal, mediante la alimentación de estos datos al programa computacional SQUAD [80].

El programa computacional SQUAD está diseñado para refinar constantes de equilibrio de un modelo químico propuesto a partir de datos de absorbancia obtenidos a diferentes longitudes de onda y con diferente composición química del sistema. El modelo químico propuesto puede ser dependiente o independiente del pH, y puede tener especies del tipo $M_m M'_l H_j L_i L'_q$, donde $m, l, j, i, q \geq 0$. El refinamiento de las constantes se logra por medio de una minimización de la suma

de los residuos de absorbancia cuadráticos (entre absorbancias teóricas y calculadas) empleando el algoritmo de Gauss-Newton:

$$U = \sum_{i=1}^I \sum_{k=1}^{NW} \left(A_{i,k}^T - A_{i,k}^E \right)^2$$

Ec. 1

donde

El proceso de minimización de la Ecuación 1 requiere el cálculo de las absorbancias a la k-ésima longitud de onda de la i-ésima solución. Por otro lado, para conocer los valores de absorbancia se necesita resolver la ecuación de Beer; SQUAD propone los coeficientes de absorptividad molar por especie, y modifica los valores de las constantes de equilibrio originalmente alimentadas, determinando la concentración de cada una a partir del modelo químico propuesto, empleando el algoritmo de Newton-Raphson.

La convergencia se da si la diferencia en la minimización de un ciclo iterativo a otro difiere como máximo en 0.001 unidades. Que el criterio anterior se cumpla no significa que se tiene el mejor refinamiento de constantes, debido a que se puede caer en una convergencia en un mínimo relativo. El análisis estadístico que presenta SQUAD, depende en gran medida de la precisión del espectrofotómetro empleado, de la cantidad de datos alimentados y sobre todo, de la complejidad química del sistema bajo estudio.

5.2 Resultados y discusión

Un ejemplo de la familia de espectros resultantes a partir de la valoración de cada uno de los metales con AF es el que se muestra en la Figura 34, el cual corresponde al sistema Pb^{2+} - AF. Es importante destacar que solo se muestra un ejemplo de estas familias de espectros porque estos son similares entre sí, y a simple vista no proporcionan información relevante.

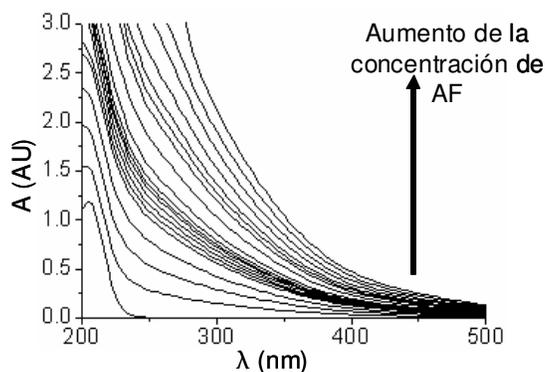


Figura 34. Espectro de absorción para la valoración de $Pb^{2+} 5 \times 10^{-5} M$ con AF estandar Elliott Soil 0.001 M.

Los espectros de absorción revelan el carácter multifuncional de los AF. Es decir, debido a los diversos grupos funcionales de las moléculas de los AF, éstos presentan espectros que absorben en toda la región UV y Vis.

A partir de los resultados obtenidos de cada valoración (como la mostrada en la Figura 34), se seleccionaron un conjunto de datos mismos que se alimentaron al programa computacional SQUAD. Dichos datos corresponden al intervalo de λ de 213 nm a 495 nm, y las concentraciones utilizadas de las soluciones de cada uno de los metales como de los AF varían de $4.63 \times 10^{-5} M$ a $4.95 \times 10^{-5} M$ y de $9.9 \times 10^{-6} M$ a $7.407 \times 10^{-5} M$ respectivamente por efecto de la dilución.

Así, se estimaron los valores de las constantes de equilibrio que se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Valores de las constantes de equilibrio AF – Metal.

Metal	Log (β_n)
Cu (II)	4.18 (\pm 0.11)
Cd (II)	4.47 (\pm 0.05)
Pb (II)	4.50 (\pm 0.06)
Hg (II)	4.31 (\pm 0.08) 9.32 (\pm 0.11)
Co (II)	4.65 (\pm 0.04) 10.98 (\pm 0.16)

Es importante mencionar que si bien la mayoría de los sistemas se ajusta a un modelo de un complejo 1:1 (metal:AF), en el caso de Hg(II) y Co(II) fue necesario contemplar dos complejos para obtener una buena convergencia. De esta forma, se puede afirmar que la afinidad de los metales con los AF, al formar complejos 1:1, decrece en el siguiente orden: $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$; y que el orden de afinidad para los complejos 1:2 (metal:AF) es el siguiente: $Co^{2+} > Hg^{2+}$.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos se concluye lo siguiente:

ESTUDIOS DE CARACTERIZACIÓN DE LOS AF:

- A partir del análisis elemental se encontraron relaciones O/C y H/C de los AF, las cuales indican que los AF que cuentan con mayor cantidad de oxígeno en su estructura son los provenientes del suelo hidalgense; esto se debe a un mayor contenido de grupos COOH y/o polisacáridos. No obstante, no se puede descartar la posibilidad de que en la muestra inicial no hubieran tantos grupos COOH y que éstos se hubieran formado durante el proceso de extracción mediante reacciones de oxidación de grupos cetónicos y aldehídicos a pesar de las precauciones tomadas (atmósfera inerte de N₂).
- A partir de la relación E₄/E₆ correspondiente a los AF de Tulancingo (4.649), se puede decir que éstos poseen altos valores de: peso molecular, grado de humificación, condensación y tiempo de residencia; al grado de entrar a los límites correspondientes a los que poseen los AH (valores menores a 5).

ESTUDIOS DE AF POR EC:

- Conforme las experiencias acumuladas durante la realización de éste trabajo, se concluye que los AF poseen muy poca estabilidad en sus estructuras moleculares. Al inicio de la experimentación no se esperaba que las señales de los AF obtenidas por EC fueran cambiando con el tiempo, ya que es un dato que no se encuentra reportado en ninguna de las referencias consultadas. Por ello, al principio no se encontraba la razón por la cual los electroferogramas no eran reproducibles, llegando a pensar que las soluciones estaban contaminadas o mal preparadas. Sin embargo, entre más experimentos se realizaban, mas evidente era que las estructuras de los AF no son estables y por consiguiente sus señales no son reproducibles en intervalos de tiempo prolongados.

- Aunado al hecho de que los electroferogramas de los AF no son reproducibles, los buffers evaluados para la obtención de señales bien definidas en su mayoría no lograron su objetivo, con excepción del buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA con el cual se obtuvieron resultados relativamente mejores. Sin embargo, al ser un buffer preparado con tres componentes, el sistema se complica en sobremanera, haciendo más difícil el estudio y entendimiento de la interacción de los AF con las moléculas del buffer.
- A pesar de la complejidad del sistema generado con la interacción del buffer de ácido bórico / TRIS / EDTA con los AF, en las figuras que muestran las familias de electroferogramas de AF con la adición de cada uno de los metales se puede apreciar que la forma de las señales cambia de diferente manera en todos los casos, indicando con ello que la interacción de los AF-metal es diferente en cada uno. Esta diferencia se corrobora con las familias de electroferogramas de los metales a los que se les va adicionando AF, en las cuales se aprecia que la altura de pico disminuye o desaparece a diferentes concentraciones de AF adicionado.

ESTUDIOS DE AF POR ESPECTROSCOPIA UV/VIS:

- La diferente interacción de los AF con cada uno de los metales es evidente en cada uno de las familias de electroferogramas presentados, sin embargo, para poder correlacionar de una manera más sustancial, se realizaron estudios por espectroscopía UV/Vis, a partir de los cuales se pudo alimentar al programa computacional SQUAD. Es evidente que en algunos casos la complejación no se limita a la interacción de un catión con “una molécula” de AF, sino que en ocasiones es necesario involucrar dos moléculas de AF, concluyendo con esto que la afinidad de los metales con los AF que forman complejos cuya relación estequiométrica es 1:1, decrece en el siguiente orden: $Pb^{2+} > Cd^{2+} > Cu^{2+}$, y que el orden de afinidad para los complejos 1:2 (metal:AF) es : $Co^{2+} > Hg^{2+}$. En el caso de los complejos

1:2, es posible que estén involucradas 2 moléculas de AF, sin embargo también cabe la posibilidad de que el complejo que se esté formando sea un quelato, en donde el enlace con el ión metálico ocurre entre un grupo carboxílico y un grupo OH fenólico adyacentes o entre dos grupos carboxílicos tipo ftalato.

7. REFERENCIAS

7. REFERENCIAS

- [1] Yufera E. P. y Carrasco J. M. (1973) Química agrícola I, Suelos y fertilizantes. Alambra. Madrid, España.
- [2] Stevenson F. J. (1982) Humus chemistry genesis, composition, reactions. Willey Interscience. Nueva York.
- [3] Schnitzer M. y Khan S. U. (1972) Humic Substances in the Environment. Marcel Dekker. Nueva York.
- [4] Gjessing E. T. (1976) Physical and Chemical Characteristics of Aquatic Humus. Ann Arbor Science. Michigan, Estados Unidos.
- [5] Steinberg C. (2003) Ecology of Humic Substances in Freshwaters. Springer
- [6] Kononova M. M. (1966) Soil Organic Matter. Pergamon; Elmsford, Nueva York.
- [7] Ehrlich H. L. (2002) Geomicrobiology. Editorial Marcel Dekker. Nueva York.
- [8] Gajdošová D., Pokorná L., Láska S., Prošek P. y Havel J. (2001) Are there humic acids in Antarctica? Humic Substances. Structures, Models and Functions. RSC. Cambridge, United Kingdom.
- [9] Kurková M., Klika Z., Kliková Ch. y Havel J. (2004) Humic acids from oxidised coal I. Elemental composition, titration curves, heavy metals in HA symplex, nuclear magnetic resonance spectra of Has and infrared spectroscopy. *Chemosphere* 54: 1237-1245.
- [10] Buffle J., Greter F. y Haerdi W. (1977) Measurement of complexation properties of humic and fulvic acids in natural waters with lead and copper ion-selective electrodes. *Anal. Chem.* (49) 2:216-222.
- [11] Manahan S. E. (1989) Humic Substances and the effect of hazardous waste chemicals, in influence of aquatics humic substances a fate and treatment of pollutants. American Chemical Society, Washington, D. C.
- [12] Grenthe I. y Puigdomenech I. (1997) Modelling in aquatic chemistry. Organisation for Economic Co-operation and Development.
- [13] Senesi N., Miano T. M., Provenzano M.R. y Brunetti G. (1991) Characterization, differentiation and classification of humic substances by

fluorescence spectroscopy. *Soil Sci.* 152: 259-271.

- [14] Suchen Cao (1993) Jiangxi Humic Acid. Application of Fulvic acid and its derivatives in the fields of agriculture and medicine. Capítulo 35. Primer edición. Zhejiang, China
- [15] Guofan Tang (1993) Jiangxi Humic Acid. Application of Fulvic acid and its derivatives in the fields of agriculture and medicine. Capítulo 36. Primer edición. Zhejiang, China
- [16] Schneider J., Weis R. y Manner C. (1996) Inhibition of HIV-1 in cell culture by synthetic humate analogues derived from hydroquinone: mechanism of inhibition. *Virology* 218: 389-395.
- [17] Van Rensburg J., Dekker Weis R., Smith T. L. y Schneider J. (2002) Investigation of the anti-HIV properties of oxihumate. *Chemotherapy* 48:138-143.
- [18] Shenyuan Yuan (1993) Jiangxi Humic Acid. Application of Fulvic acid and its derivatives in the fields of agriculture and medicine. Capítulo 34. Primer edición. Zhejiang, China
- [19] <http://www.fulvic.com/healthalert/longevity.htm> (Octubre 2005)
- [20] <http://www.ihss.gatech.edu/soilhafa.html> (Enero 2006)
- [21] Pelekani C., Newcombe G., Snoeyink V. L., Hepplewhite C., Assemi S. y Beckett R. (1999) Characterization of natural organic matter using high performance size exclusion chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 33:2807-2813.
- [22] Conte P. y Piccolo A. (1999) Conformational arrangement of humic substances. Influence of solution composition on association of humic molecules. *Environ. Sci. Technol.*, 33:1682-1690.
- [23] Beckett R., Jue Z. y Giddings J. C. (1987) Determination of molecular weight distributions of fulvic and humic acids using flow field-flow fractionation. *Environ. Sci. Technol.*, 21:289-295.
- [24] Leenheer J. A., Rostad C. E., Gates P. M., Furlong E. T. y Ferrer I. (2001) Molecular resolution and fragmentation of fulvic acid by electrospray ionization/multistage tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* 73:1461-1471.

- [25] Rostad C. E. y Leenheer J. A. (2004) Factors that affect molecular weight distribution of Suwannee river fulvic acid as determined by electrospray ionization/mass spectrometry. *Anal. Chem. A.* 523:269–278.
- [26] Reemtsma T. y These A. (2005) Comparative investigation of low-molecular-weight fulvic acids of different origin by SEC-Q-TOF-MS: New insights into structure and formation. *Environ. Sci. Technol.* 39:3507-3512.
- [27] Reemtsma T. y These A. (2003) On-line coupling of size exclusion chromatography with electrospray ionization-tandem mass spectrometry for the analysis of aquatic fulvic and humic acids. *Anal. Chem.* 75:1500-1507.
- [28] Morris K. F., Cutak B. J., Dixon A. M. y Larive C. K. (1999) Analysis of diffusion coefficient distributions in humic and fulvic acids by means of diffusion ordered NMR spectroscopy, *Anal. Chem.* 71:5315-5321.
- [29] Novotny F. J., Rice J. A. y Weil D. A. (1995) Characterization of fulvic acid by laser-desorption mass spectrometry. *Environ. Sci. Technol.*, 29:2464-2466.
- [30] Cook R. L., McIntyre D. D., Langford C. H. y Vogel H. J. (2003) A comprehensive liquid-state heteronuclear and multidimensional NMR study of Laurentian fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* 37:3935-3944.
- [31] Wilson M. A., Vassallo A. M., Perdue E. M. y Reuter J. H. (1987) Compositional and solid-state nuclear magnetic resonance study of humic and fulvic acid fractions of soil organic matter. *Anal. Chem.* (59) 15:551-558.
- [32] Wershaw R. L., Mikita M. A. y Steelink C. (1981) Direct ¹³C NMR evidence for carbohydrate moieties in fulvic acids. *Environ. Sci. Technol.* (15) 12:1461-1463.
- [33] Saleh F. Y., Chang D. Y. y Frye J. S (1983) Cross polarization carbon- 13 nuclear magnetic resonance and fast atom bombardment mass spectrometry of fractionated fulvic acid. *Anal. Chem.*, 55:862-866.
- [34] Haiber S., Herzog H., Burba P., Gosciniak B. y Lambert J. (2001) Two-dimensional NMR studies of size fractionated Suwannee river fulvic and humic acid reference. *Environ. Sci. Technol.* 35:4289-4294.
- [35] Wu F. C., Evans R. D. y Dillon P. J. (2002) High-performance liquid chromatographic fractionation and characterization of fulvic acid. *Anal. Chem*

A. 464:47–55.

- [36] Aiken G. R. (1984) Evaluation of ultrafiltration for determining molecular weight of fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* (18) 12:978-981.
- [37] Bertlno D. J., Albro P. W. y Hasst J. R. (1987) Enzymatic hydrolysis of carbohydrates in aquatic fulvic acid. *Environ. Sci. Technol.* (21) 9:859-863.
- [38] Machesky M. L. (1993) Calorimetric acid-base titrations of aquatic and peat-derived fulvic and humic acids. *Environ. Sci. Technol.* 27:1182-1189.
- [39] Solouki T., Freitas M. A. y Alomary A. (1999) Gas-phase hydrogen/deuterium exchange reactions of fulvic acids: an electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectral study. *Anal. Chem.* 71:4719-4726.
- [40] Schmitt-Kopplin P., Garrison A. W., Perdue E. M., Freitag D. y Kettrup A. (1998) Capillary electrophoresis in the analysis of humic substances. Facts and artifacts. *J. Chrom. A.* 807:101–109.
- [41] Schmitt-Kopplin P., Hertkorn N., Freitag D., Kettrup A., Garmash A. V., Kudryavtsev A. V., Perminova I. y Petroyan V. S. (1999) Movility distribution of synthetic and natural polyelectrolytes with capillary zone electrophoresis. *Journal of AOAC International.* (82) 6:1596-1603.
- [42] Schmitt-Kopplin P. y Junkers J. (2003) Capillary zone electrophoresis of natural organic matter. *J. Chrom. A.* 998:1–20.
- [43] Junkers J., Schmitt-Kopplin P., Munch J. C. y Kettrup A. (2002) Up-scaling capillary zone electrophoresis separations of polydisperse anionic polyelectrolytes with preparative free-flow electrophoresis exemplified with a soil fulvic acid. *Electrophoresis.* 23:2872–2879.
- [44] Cavan L., Ciavatta C., Trubetskaya O. E., Reznikova O. I., Afanas'eva G. V. y Trubetskoj O. A. (2003) Capillary zone electrophoresis of soil humic acid fractions obtained by coupling size-exclusion chromatography and polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Chrom. A.* 983:263–270.
- [45] Janos P. (2003) Separation methods in the chemistry of humic substances. *J. Chrom. A.* 983:1–18.
- [46] Peuravuori J., Lehtonen T., Lepane V. y Pihlaja K. (2005) Comparative study

for differentiation of aquatic humic-type organic constituents by capillary zone electrophoresis using polyvinyl alcohol-coated capillary. *Talanta* 67 : 103–111

- [47] Pompe S., Heise K. H. y Nitsche H. (1994) Capillary electrophoresis for a "finger-print"- characterization of fulvic and humic acids. Reporte anual 1994 del Institute of Radiochemistry Forschungszentrum Rossendorf en Grenoble, France.
- [48] Essington M. E. (2003) Soil and water chemistry. CRC Press
- [49] Bresnahan W. T., Grant C. L. y Weber J. H. (1978) Stability constants for the complexation of Copper(II) ions with water and soil fulvic acids measured by an ion selective electrode. *Anal. Chem.* (50) 12:1679-1679.
- [50] Saar R. A. y Weber J. H. (1980) Comparison of spectrofluorometry and ion-selective electrode potentiometry for determination of complexes between fulvic acid and heavy-metal ions. *Anal. Chem.* (52) 13:2095-2100.
- [51] Bhat G. A., Saar R. A, Smart R. B. y Weber J. H. (1981) Titration of soil-derived fulvic acid by copper(II) and measurement of free copper(II) by anodic stripping voltametry and copper(II) selective electrode. *Anal. Chem.* 53:2275-2280.
- [52] Celo V., Murimboh J., Salam M. S. A. y Chakrabarti C. L. (2001) A kinetic study of nickel complexation in model systems by adsorptive cathodic stripping voltammetry. *Environ. Sci. Technol.* 35:1084-1089.
- [53] Temminghoff E. J. M., Van Der Zee S. E. A. T. M. y De Haan F. A. M. (1997) Copper mobility in a copper-contaminated sandy soil as affected by pH and solid and dissolved organic matter. *Environ. Sci. Technol.* 31:1109-1115.
- [54] Wu J., West L. J. y Stewart D. I. (2002) Effect of humic substances on Cu (II) solubility in kaolin-Sand soil. *J. Hazardous Materials.* 94:223–238.
- [55] Mandal R., Salam M. S. A., Murimboh J., Hassann N. M. , Chakrabarti C. L. y Back M. H. (2000) Competition of Ca(II) and Mg(II) with Ni(II) for binding by a well-characterized fulvic acid in model solutions. *Environ. Sci. Technol.* 34:2201-2208.
- [56] Leenheer J. A., Brown G. K., MacCarthy P. y Cabaniss S. E. (1998) Models

- of metal binding structures in fulvic acid from the Suwannee river, Georgia. *Environ. Sci. Technol.* 32:2410-2416.
- [57] Otto W. H., Burton S. D., Harper W. R. y Larive C. K. (2001) Examination of cadmium(II) complexation by the Suwannee river fulvic acid using ^{113}Cd NMR relaxation measurements. *Environ. Sci. Technol.* 35:4900-4904.
- [58] Otto W. H., Carper W. R. y Larive C. K. (2001) Measurement of cadmium(II) and calcium(II) complexation by fulvic acids using ^{113}Cd NMR. *Environ. Sci. Technol.* 35:1463-1468.
- [59] Larive C., Rogers A., Morton M. y Carper W. R. (1996) ^{113}Cd NMR binding studies of Cd-fulvic acid complexes: evidence of fast exchange. *Environ. Sci. Technol.* 30:2828-2831.
- [60] Alomary A., Solouki T., Patterson H. H. y Cronan C. S. (2000) Elucidation of aluminum-fulvic acid interactions by gas-phase hydrogen/deuterium (H/D) exchange and electrospray fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry (ESI FT-ICR). *Environ. Sci. Technol.* 34:2830-2838.
- [61] Übner M. Kaljurand M. y Lopp M. (2004) Interactions of Pb^{2+} with fulvic acid by electrophoretically mediated on-capillary microanalysis. *J. Chrom. A.* 1057:253–256
- [62] <http://www.ihss.gatech.edu/sources.html> (Enero 2006)
- [63] Valdespino C. R. (1984) Monografía del municipio de Tulancingo de Bravo, Estado de Hidalgo.
- [64] Aiken G. R., Thurman E. M., Malcolm R. L. y Walton H. F. (1979) Comparison of XAD macroporous resins for the concentration of fulvic acid from aqueous solution. *Anal. Chem.* (51) 11: 1799-1803
- [65] <http://www.serva.de/products/knowledge/071119.shtml> (Enero 2006)
- [66] Reinhardt A. (2004) Contrasting roles of natural organic matter on colloidal stabilization and flocculation in freshwaters (Tesis de doctorado) Universidad de Génova. Saverne, Francia.
- [67] Chen Y., Senesi N. y Schnitzer M. (1977) Information provided on humic substances by E_4/E_6 ratios. *Soil Sci. Soc. Am. J.* 41: 352-358
- [68] Ghabbour E. y Davies G. (2002) Humic substances, structures, models and

functions. Royal Society of Chemistry.

- [69] www.solvaychemicals.us (Diciembre 2005)
- [70] Conley R. T. (1979) Espectroscopia infrarroja. Alambra. Madrid, España.
- [71] Pacheco H. M. L. (2002) Humic acids: Capillary Electrophoresis and MALDI-TOF Mass spectrometry (Tesis de doctorado) Universidad de Masaryk, Brno, República Checa.
- [72] Agilent Technologies (2000) An introduction High performance capillary electrophoresis. USA.
- [73] Guol M. y Chorover J. (2003) Transport and fractionation of dissolved organic matter in soil columns. *Soil Science* (168) 2:110-118
- [74] Karthikeyan K.G. y Chorover J. (2002) Humic acid complexation of basic and neutral polycyclic aromatic compounds. *Chemosphere* 48: 955–964.
- [75] Schmid M. G, Wirnsberger K., Jira T., Bunke A. y Gübitz G. (1997) Capillary electrophoretic chiral resolution of vicinal diols by complexation with borate and cyclodextrin: comparative studies on different cyclodextrin derivatives. *Chirality* 9:153–156
- [76] Nieto V. S. (2005) Análisis y caracterización de ácidos húmicos y su interacción con algunos metales pesados (Tesis de maestría) Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- [77] Ondra J. N. y Ellis B. (1998) Soil and composting. Houghton Mifflin Gardening.
- [78] Radosevich R. S., Holt S. J. y Ghera C. (1997) Weed ecology. John Wiley and Sons. Nueva York.
- [79] Sparks D. L. (1998) Soil physical chemistry. CRC Press.
- [80] Legget, D. J. (1985) Computational methods for the determination of formation constants. Plenum Press. New York.