



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

***Estabilidad de Ácidos Húmicos y su Influencia
en la Interacción con Cu(II) y Pb(II)***

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE

PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN QUÍMICA

P R E S E N T A

M. C. Silvia Nieto Velázquez

Director de Tesis: Dra. María Elena Páez Hernández

Co-Director: Dr. Carlos Andrés Galán Vidal

Mineral de la Reforma, Hidalgo

Junio 2010



El presente trabajo se realizó en el:

1. Laboratorio de Química Analítica del Área Académica de Química de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.
2. Laboratorio de Análisis Térmico del Área Académica de Materiales y Metalurgia de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.



Los resultados del presente trabajo fueron aceptados para su presentación en los siguientes eventos científicos:

1. Silvia Nieto Velázquez, Ma. Elena Páez Hernández. *Análisis y caracterización de ácidos húmicos (AHs)*. II Congreso Iberoamericano y IV Congreso Argentino de Química Analítica. Celebrado en agosto de 2007, Buenos Aires, Argentina.
2. Silvia Nieto Velázquez, Carlos Andrés Galán Vidal, Gian Arturo Álvarez Romero, Julio César Botello Pozos, María Elena Páez Hernández. *Efecto de la Extracción Sucesiva de Ácidos Húmicos Sobre la Constante de Equilibrio de su Complejo con Cu(II)*. XXIII Congreso Nacional de Química Analítica. Celebrado en junio y julio de 2010, Acapulco, Guerrero, México.



Los resultados del presente trabajo se publicaron como memorias en extenso en:

Silvia Nieto Velázquez, Carlos Andrés Galán Vidal, Giaan Arturo Álvarez Romero, Julio César Botello Pozos, María Elena Páez Hernández. *Efecto de la Extracción Sucesiva de Ácidos Húmicos Sobre la Constante de Equilibrio de su Complejo con Cu(II)*. Memorias en extenso del XXIII Congreso Nacional de Química Analítica, realizado el 30 de junio, 1 y 2 de julio de 2010, Acapulco, Guerrero, México. Págs. 92-97. ISBN 978-607-9048-01-3



Silvia Nieto Velázquez agradece la beca otorgada por CONACyT para la realización de sus estudios de Doctorado (No. de Becario: 176682).

AGRADECIMIENTOS:

Quiero agradecer a cada una de las personas que directa o indirectamente me han dado su apoyo para el desarrollo de esta investigación, sin ellos hubiese sido imposible alcanzar las metas trazadas en este estudio.

Gracias a Dios por la fuerza y la ayuda recibida en el momento justo.

Gracias a mis padres por su apoyo, esfuerzo y dedicación en mi formación como persona. Por enseñarme lo que ninguna escuela me hubiese podido enseñar y por recordarme que la vida y el futuro se hacen a base de sacrificios.

Quiero dar las gracias a mi esposo por estar conmigo en las buenas y en las malas; y por su gran apoyo.

Gracias a mis hijos que me ha dado Dios, ellos son la luz de mis ojos.

Gracias a la Doctora María Elena Páez por haber confiado en mí y darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado bajo su asesoría, gracias al Doctor Carlos Andrés Galán por toda la ayuda brindada en la realización de este trabajo, de igual forma a los Doctores: Julio César Botello y Joseantonio Godoy. A todos los Doctores les agradezco su apoyo y asesoramiento para mejorar la calidad del presente trabajo y de la tesis, gracias por su dedicación y su valioso tiempo.

Agradezco a todos mis compañeros de laboratorio en especial a Irma y Yucundo, gracias por su ayuda y apoyo.

ÍNDICE

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Notaciones	viii
Capítulo 1. INTRODUCCIÓN	1
Capítulo 2. ANTECEDENTES	5
2.1 Origen y características de los Ácidos Húmicos	6
2.2 Estructuras teóricas propuestas de los Ácidos Húmicos	7
2.3 Propiedades y aplicaciones de los Ácidos Húmicos	11
2.3.1 <i>Propiedades más relevantes de los Ácidos Húmicos</i>	11
2.3.2 <i>Aplicaciones de los Ácidos Húmicos</i>	14
2.3.3 <i>Reactividad de los Ácidos Húmicos como agentes complejantes de metales</i>	14
2.4 Métodos y técnicas analíticas generales para el análisis y caracterización de los Ácidos Húmicos	15
2.5 Métodos de extracción y fraccionamiento de los Ácidos Húmicos	17
2.5.1 <i>Factores que influyen en la extracción de los Ácidos Húmicos</i>	19
2.5.1.1 <i>Concentración y tipo de extractante</i>	19
2.5.1.2 <i>Relación de extracción</i>	20
2.5.1.3 <i>Tiempo de extracción</i>	21
2.5.1.4 <i>Temperatura de extracción</i>	21
2.5.2 <i>Factores que influyen en el fraccionamiento de los Ácidos Húmicos</i>	22
2.5.3 <i>Métodos y técnicas de purificación de los Ácidos Húmicos</i>	23
2.6 Estudios de estabilidad y degradación cinética en la macromolécula de los Ácidos Húmicos en sólido y solución acuosa	24
2.6.1 <i>Efecto del pH</i>	24
2.6.2 <i>Efecto del calentamiento</i>	25
2.6.3 <i>Efecto de la radiación</i>	26

Capítulo 3. OBJETIVOS	28
3.1 Objetivo general	29
3.2 Objetivos específicos	29
Capítulo 4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL	30
4.1 Extracción y purificación del Ácido Húmico proveniente del suelo	31
4.2 Caracterización de Ácidos Húmicos comerciales (leonardita y lignina) y Ácido Húmico extraído del suelo	32
4.2.1 <i>Análisis elemental</i>	32
4.2.2 <i>Porcentaje de carbono: orgánico, inorgánico y total</i>	32
4.2.3 <i>Determinación del contenido de cenizas</i>	36
4.2.4 <i>Espectroscopia ultravioleta/visible</i>	37
4.2.5 <i>Determinación de la Acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos</i>	38
4.2.6 <i>Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier</i>	40
4.2.7 <i>Calorimetría diferencial de barrido y Análisis termogravimétrico</i>	41
4.3 Efecto del pH en la macromolécula del Ácido Húmico mediante titulaciones espectro-potenciométricas	42
4.4 Efecto de los procesos de solubilización y precipitación en la estabilidad del Ácido Húmico por medio de re-extracciones continuas	43
4.4.1 <i>Cinéticas en solución acusa de las fracciones de Ácido Húmico mediante espectroscopia ultravioleta/visible</i>	44
4.4.2 <i>Termo-análisis en sólido de las fracciones de Ácido Húmico por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier</i>	44
4.5 Estimación de las constantes de equilibrio de complejación de los Ácidos Húmicos y las fracciones obtenidas: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V con Cu (II) y Pb (II)	45

Capítulo 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
5.1 Caracterización y comparación de Ácidos Húmicos (comerciales y extraído en el laboratorio) por técnicas analíticas	50
5.1.1 <i>Análisis elemental</i>	50
5.1.2 <i>Porcentaje de carbono: orgánico, inorgánico y total, y contenido de cenizas</i>	52
5.1.3 <i>Espectroscopia ultravioleta/visible</i>	53
5.1.4 <i>Acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos</i>	55
5.1.5 <i>Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier</i>	55
5.1.6 <i>Calorimetría diferencial de barrido y análisis termogravimétrico</i>	58
5.2 Efecto del pH en la macromolécula del Ácido Húmico mediante titulaciones espectro-potenciométricas	62
5.3 Efecto de los procesos de solubilización y precipitación en la estabilidad del Ácido Húmico por medio de re-extracciones continuas	66
5.3.1 Caracterización de las fracciones obtenidas en el proceso de re-extracción utilizando diferentes técnicas analíticas	66
5.3.1.1 <i>Análisis elemental</i>	66
5.3.1.2 <i>Espectroscopia UV/Vis</i>	68
5.3.1.3 <i>Espectroscopia de IRTF</i>	69
5.3.1.4 <i>CDB y ATG</i>	70
5.3.1.5 <i>Acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos</i>	72
5.3.2 <i>Cinéticas en solución acusa de las fracciones de Ácido Húmico mediante espectroscopia ultravioleta/visible</i>	73
5.3.3 <i>Termo-análisis en sólido de las fracciones de Ácido Húmico por calorimetría diferencial de barrido y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier</i>	76
5.4 Estimación de las constantes de equilibrio de complejación de los Ácidos Húmicos con Cu (II) y Pb (II)	78
Capítulo 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	83
Capítulo 7. REFERENCIAS	88

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Esquema de los caminos propuestos para la formación de Sustancias Húmicas	7
2. Modelo de construcción por bloques de AH a partir de la conversión de la lignina	9
3. Modelo hipotético de la estructura de AH propuesta por Sein, Varnum y Cansen	10
4. Clasificación de las Sustancias Húmicas con base en su solubilidad en medios alcalinos y/o ácidos	18
5. Estructura básica de la resina de polivinilpirrolidona	22
6. Interacción del AH por la radiación UV/Vis y las implicaciones ambientales que se derivan	26
7. Esquema para la determinación de CI	35
8. Esquema para la determinación de CT	36
9. Espectros de UV/Vis del AH-Le utilizando diferentes factores de dilución: [A] 50, [B] 67, [C] 100, [D] 200	53
10. Espectros de absorción UV/Vis: [A] AH-Le, [B] AH-S y [C] AH-L, 10 mg/L, pH =11.09, longitud de celda: 1 cm	54
11. Espectro de IRTF: [A] AH-Le, [B] AH-L y [C] AH-S analizados en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr	56
12. Termogramas de AH-S: [A] CDB y [B] ATG. Utilizando para ambos casos 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C / min, gas de arrastre: N ₂ con un flujo de 20 mL / min y calibración con Indio	59
13. Termogramas: ATG [A] AH-Le, [B] AH-L y [C] AH-S. Utilizando para ambas técnicas 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C/min, gas de arrastre: N ₂ con un flujo de 20 mL/min	61
14. CDB [A] AH-S, [B] AH-L y [C] AH-Le. Utilizando para ambas técnicas 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C/min, gas de arrastre: N ₂ con un flujo de 20 mL/min	61
15. Titulaciones ácido-base del AH-L con una concentración inicial de 10 ppm. Titulando primero con HCl 4x10 ⁻³ N y posteriormente, con	64

NaOH 4×10^{-3} N

16. Absorbancias obtenidas a una $\lambda = 280$ nm a diferentes pHs. En la secuencia de titulaciones ácido-base 65
17. Absorbancias obtenidas a una longitud de onda de $\lambda = 280$ nm de las fracciones: [A] fracción AH-I hasta AH-IV; [B] fracción AH-I hasta AH-V 69
18. Espectros de IR de las fracciones del AH-L (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AHV), analizadas en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr para: [A] Lote I, [B] Lote II 70
19. Termogramas de las fracciones AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V: [A] CDB; [B] ATG. Utilizando ≈ 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C / min, gas de arrastre: N_2 con un flujo de 20 mL / min y calibración con Indio 71
20. Absorbancias obtenidas a una longitud de onda de $\lambda = 280$ nm de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V en diferentes tiempos. Concentraciones: 10 ppm 74
21. Absorbancias obtenidas ($\lambda = 280$ nm) de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V con respecto al tiempo. Concentraciones: 10 ppm 74
22. Espectros de IR de las fracciones del AH-L (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AHV), analizadas en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr. Después de un tratamiento térmico por CDB de: [A] 25 a 150 °C, [B] 25 a 300 °C y [C] 25 a 500 °C 77
23. Curvas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH- Cu^{2+} para los AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído (AH-S) 78
24. Curvas representativas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH- Cu^{2+} de cada fracción obtenida (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V) del AH-L 79
25. Curvas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH- Pb^{2+} para los AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído (AH-S) 79
26. Curvas representativas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH- Pb^{2+} de cada fracción obtenida (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V) del AH-L 80

ÍNDICE DE TABLAS

1. Participación de los AHs en procesos ambientales	13
2. Métodos comunes para la caracterización de los AHs	16-17
3. Extractantes de SHs comúnmente utilizados	20
4. Composición elemental de los AHs en estudio y las relaciones: H/C y O/C con base en la relación de sus átomos	50
5. Caracterización de los AHs en estudio (composición de CO, Cl, CT, cenizas, propiedades espectroscópicas, acidez total y cantidad de grupos funcionales: -COOH y -OH)	52
6. Asignación de las bandas de absorción de los espectros de infrarrojo de la Figura 12	57
7. Propiedades térmicas del AH-S	60
8. Propiedades térmicas de los AHs (AH-Le, AH-L y AH-S) por CDB y ATG	61
9. Composición elemental de las fracciones obtenidas a partir del AH-L en estudio y las relaciones: H/C y O/C con base en la relación de sus átomos. (Valores medios del lote I y lote II)	67
10. Propiedades espectroscópicas de las fracciones del AH-L (Valores medios del lote I y lote II)	68
11. Propiedades térmicas de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V por CDB y ATG	71
12. Acidez total y cantidad de grupos funcionales (-COOH y -OH) en las fracciones del AH-L	73
13. Porcentajes de aromaticidad de las fracciones del AH-L en diferentes meses	75
14. Valores estimados de la interacción de Cu^{2+} y Pb^{2+} con AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído del suelo (AH-S)	80
15. Valores estimados de la interacción de Cu^{2+} y Pb^{2+} con cada fracción del AH-L: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V	80

NOTACIONES

AHs	Ácidos Húmicos
SHs	Sustancias Húmicas
AFs	Ácidos Fúlvicos
Hs	Huminas
AH-Le	Ácido Húmico Leonardita
AH-L	Ácido Húmico Lignina
AH-S	Ácido Húmico Suelo
AE	Análisis elemental
UV/Vis	Espectroscopia ultravioleta visible
IRTF	Espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier
AA	Espectroscopia de absorción atómica
ATG	Análisis termogravimétrico
CDB	Calorimetría diferencial de barrido
CG/MS	Cromatografía de gases/acoplado a masas
CL/MS	Cromatografía de líquidos/acoplado a masas
MS	Espectroscopia de masas
RMN	Resonancia magnética nuclear
REP	Resonancia paramagnética electrónica
EC	Electroforesis capilar
IHSS	Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas
TNB	Temple-Northeastern-Birmingham
CIC	Capacidad de intercambio catiónico
MO	Materia orgánica
MOS	Materia orgánica soluble
CO	Carbono orgánico
CI	Carbono inorgánico
CT	Carbono total
PVP	Polivinilpirrolidona
NH	No Humificada

***Capítulo 1.* Introducción**

1. INTRODUCCIÓN

Los ácidos húmicos (AHs) son polímeros naturales altamente reactivos con gran complejidad estructural y variabilidad. Debido a su polifuncionalidad presentan interesantes y útiles propiedades físicas, químicas y biológicas, lo cual ha hecho atractivo su estudio desde hace más de 200 años. Sin embargo, su origen y estructura aún no han sido esclarecidos totalmente, por lo cual, continúa el interés por conocer y describir más precisa y detalladamente sus propiedades termodinámicas y fisicoquímicas.

La estabilidad de los AHs es una característica fundamental y poco abordada en la literatura científica, no obstante que compromete la gran cantidad de aplicaciones en los campos de la agricultura, industria y farmacia, entre otros; también cabe destacar el particular interés que se despierta actualmente por su relevancia en el medio ambiente para inducir procesos de mejoramiento en las propiedades físicas o químicas en suelo y agua. Es por todo lo anteriormente expuesto, que en este proyecto de investigación se plantea el estudio sistemático y formal de la estabilidad de los AHs tomando en cuenta diversas variables como: temperatura, tiempo y pH; y cómo se correlacionan éstos con los cambios de su estructura, reactividad y propiedades en general.

En el presente trabajo de investigación se analizaron AHs comerciales (leonardita y lignina) y un AH de procedencia (suelo) con características distintas, debido a las diferencias que presentan en cuanto a su origen y la cantidad de ácidos que poseen (grado de humificación) a causa de diversos factores como el clima, biomasa vegetal y animal, antigüedad y método de extracción, entre otros. Por lo tanto, todo esto redundará en un mejor análisis y comparación de los parámetros (solubilidad, precipitación ácida, temperatura y pH, entre otros) que afectan la estabilidad de éstas moléculas.

El desarrollo de esta tesis comienza en el Capítulo 2, donde se presentan los antecedentes teóricos importantes sobre el origen y las características de los AHs, las estructuras teóricas propuestas, sus propiedades, aplicaciones e importancia en diversos campos o disciplinas, los métodos y técnicas analíticas generales para su análisis y caracterización, incluyendo los métodos de extracción de ácidos húmicos utilizados comúnmente; finalmente, se presentan los estudios realizados hasta ahora relacionados con la estabilidad y degradación cinética (efecto con: la acidez y basicidad, calentamiento y la reactividad como agente complejante de metales) en la macromolécula de los AHs en sólido y solución.

En el Capítulo 3, se presenta el objetivo general del estudio así como los objetivos específicos; posteriormente, en el Capítulo 4, se detalla la metodología experimental, donde se describen los procedimientos para la obtención de los AHs de un suelo proveniente de Atotonilco el Grande, Hidalgo; se prosigue con la descripción de las técnicas realizadas para la caracterización de los AHs en estudio, determinando el porcentaje de materia orgánica (MO) con base en la cuantificación de carbono orgánico (CO), carbono inorgánico (CI) y carbono total (CT), análisis elemental (AE) [porcentajes totales de los componentes elementales (carbono, hidrógeno, nitrógeno y por diferencia oxígeno)] y las relaciones H/C y O/C con base en la relación de sus átomos. Se hace mención también al análisis gravimétrico de las muestras para la determinación de materia inorgánica presente. Posteriormente, se presentan los procedimientos para la realización de titulaciones potenciométricas ácido/base que sirven de base para la determinación de las propiedades ácidas y la capacidad de intercambio de los AHs, obteniendo los correspondientes resultados de la acidez total y cantidad de grupos carboxílicos e hidroxilos fenólicos.

Mediante técnicas espectroscópicas como: espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier (IRTF), se identificaron los principales grupos funcionales (-OH, -COOH, -NH, -CO, -CH, compuestos aromáticos y alifáticos); por

espectroscopia ultravioleta/visible (UV/Vis) se obtuvieron las absorbancias correspondientes para calcular sus diferentes propiedades espectroscópicas como: absorptividad molar, porcentaje de aromaticidad, peso molecular promedio y el cociente E_4/E_6 . Finalmente, por medio del análisis termogravimétrico (ATG) y calorimetría diferencial de barrido (CDB), fue posible obtener parámetros químicos y físicos (entalpías, porcentaje de pérdida en peso por la eliminación de agua química y moléculas pequeñas) de los AHs en función de la temperatura.

Se prosigue con el análisis del efecto del pH mediante titulaciones espectro-potenciométricas y el efecto del proceso de solubilidad y precipitación en la estabilidad del AH por medio de re-extracciones continuas. En el proceso de re-extracción se obtuvieron cinco fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V (este proceso se realizó por duplicado), las cuales se caracterizaron de la misma manera que los AHs mencionados anteriormente. Por otro lado, de las cinco fracciones obtenidas del primer lote se realizaron cinéticas en solución acuosa mediante espectroscopia UV/Vis y termo-análisis en sólido por CDB y IRTF. Finalmente, se calcularon las constantes de equilibrio de complejación de los AHs en estudio y de cada una de las fracciones obtenidas (lote I y lote II) con Cu (II) y Pb (II) utilizando resinas de intercambio catiónico y el equipo de espectroscopia de absorción atómica (AA).

En el Capítulo 5 se presentan los resultados y la discusión de cada uno de los temas mencionados en el Capítulo anterior, posteriormente, se presentan las conclusiones y perspectivas más relevantes y generales sobre el trabajo realizado, y para finalizar se exponen las referencias consultadas durante la elaboración del trabajo.

Capítulo 2. Antecedentes

2. ANTECEDENTES

2.1 ORIGEN Y CARACTERÍSTICAS DE LOS AHs

La materia orgánica (MO) se define como un conjunto de componentes orgánicos de origen animal o vegetal que se encuentran en diferentes estados de descomposición, transformación y/o degradación hasta llegar a mineralizarse debido a la acción de microorganismos. Dando lugar a la humificación, el cual es un proceso evolutivo que consiste en la modificación de tejidos originales y de la síntesis de los organismos del suelo en compuestos poliméricos hasta llegar a compuestos más simples (monosacáridos, aminoácidos, fenoles, quinonas, amidas y aminas, principalmente), que interaccionan nuevamente produciendo un conjunto de compuestos estables de color oscuro o negruzco, amorfos y coloidales, conocidos con el nombre de humus o sustancias húmicas (SHs) [1]. Existen cuatro caminos teóricos propuestos acerca del proceso de formación de las SHs (Figura 1), sin embargo se pueden sintetizar a partir de cualquier mecanismo, interviniendo en cada uno de ellos múltiples moléculas y una gran diversidad de reacciones químicas [2].

Por lo tanto, la formación de estas sustancias puede deberse a muchos tipos de mecanismos de reacción, a pesar de que la mayoría de los investigadores están a favor del mecanismo basado en la condensación de compuestos fenólicos y quinonas (Figura 1-mecanismo 2) [1, 3].

Las SHs están formadas por huminas (Hs), ácidos fúlvicos (AFs) y ácidos húmicos (AHs), que logran extraerse de forma separada de acuerdo a la solubilidad que presentan en diferentes disolventes [4-5]. Las diferencias más relevantes que presentan en las características físicas y químicas de los componentes de las SHs (AHs, AFs y Hs) son: la intensidad de color, la variación en el peso molecular,

grado de polimerización, tipo y número de grupos funcionales, acidez total (AFs 9-14 meq/g, AHs 4-8.7 meq/g) y solubilidad.

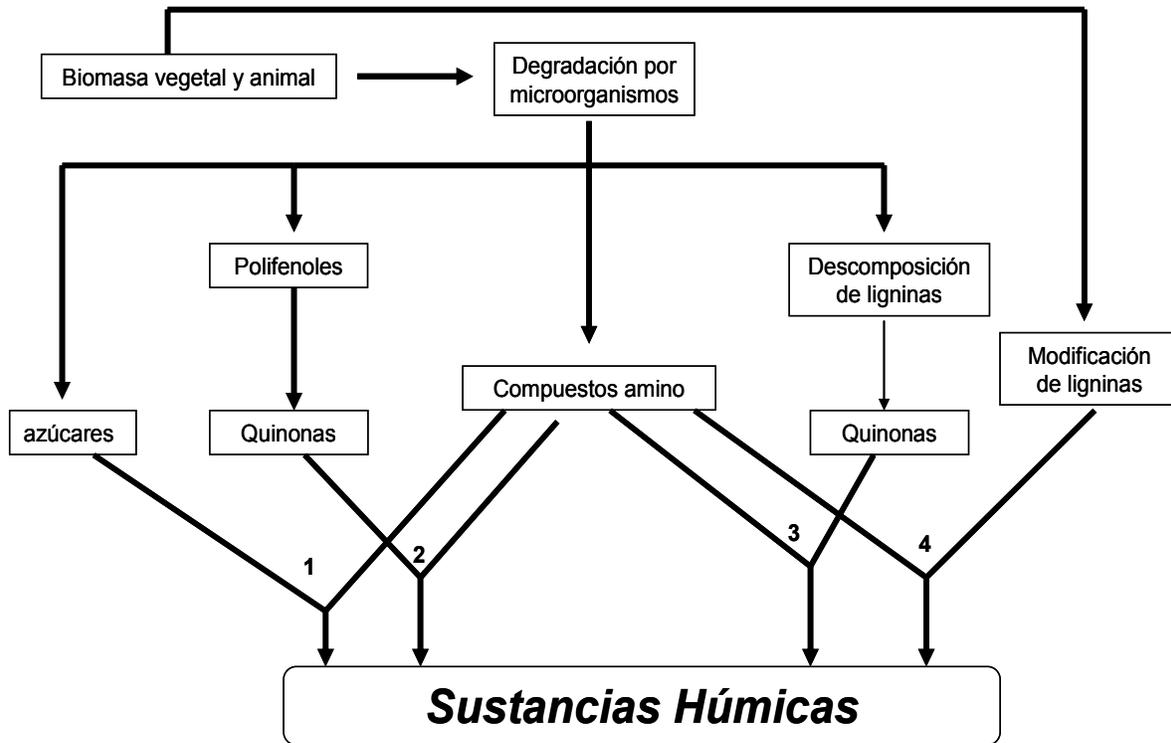


Figura 1. Esquema de los caminos propuestos para la formación de SHs.

Por otro lado, los AHs se consideran los componentes principales de la MO de suelo, agua y sedimentos, son insolubles en medio acuoso bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$) pero son solubles a valores de pH mayores; tienen una carga negativa y su color en solución es café [6-7]. Todas las características que se acaban de mencionar se deben a la gran cantidad de grupos funcionales que posee la estructura del AH sobre todo grupos carboxílicos y fenólicos ($-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$).

2.2 ESTRUCTURAS TEÓRICAS PROPUESTAS DE LOS AHs

Los AHs han sido estudiados ampliamente por sus notables propiedades ambientales, bioquímicas y terapéuticas, sin embargo, se tienen pocos estudios

teóricos basados específicamente en su estructura, esto se debe sobre todo a la complejidad estructural que presentan. Con la ayuda de nuevas técnicas y métodos analíticos, varios científicos en diferentes épocas (Dragunov Stevenson, Schulten, Schnitzer, Swift, entre otros) [8-11], han podido caracterizar estos compuestos obteniendo una mayor información estructural y por consiguiente, proponiendo estructuras o modelos teóricos, que aunque discrepan entre ellas, estas poseen semejanzas en cuanto al número y tipo de grupos funcionales presentes. Por esta razón, la estructura química de los AHs ha sido uno de los temas de investigación más controvertidos de las últimas décadas para los investigadores de la ciencia del suelo, y pocos son los modelos capaces de describir adecuadamente la complejidad estructural de estas sustancias ubicuas en la naturaleza. J. Burdon afirma que los modelos propuestos tradicionales para las estructuras de los AHs, que se basan en teorías de formación y en reacciones químicas que se producen, no pueden ser reales, ya que no existen en el suelo como tales, también hace mención sobre la materia orgánica que consiste en una mezcla compleja de productos de degradación de restos vegetales y compuestos de síntesis metabólica de microorganismos presentes en el suelo, que se someten a un proceso de humificación y deben ser explicados como una combinación de métodos químicos y biológicos [12]. Aunque resulta aún imposible dilucidar exactamente la estructura de los AHs, en cambio sí es posible hacer hipótesis sobre los diferentes modelos estructurales basándose en datos derivados de procesos degradativos o de pirólisis y de una serie de estudios analíticos [13].

Desde el punto de vista estructural, Young y Steelink propusieron que los AHs se van construyendo por bloques, los cuales provienen de la conversión de ligninas y taninos, y por biosíntesis de aminoácidos (aunque la lignina también es biosintetizada por aminoácidos) [14]. Actualmente, la molécula de AH llamada Temple-Northeastern-Birmingham (TNB) (Figura 2) [15, 16, 17, 18], se genera a partir de diversas reacciones claves como: desmetilación, hidroxilación, destrucciones oxidativas o transformaciones de las cadenas laterales, apertura de los anillos aromáticos, adición nucleófila de compuestos amino con formación de

aminas aromáticas, entre otras. Todas estas reacciones ocurren en la degradación de los componentes de la lignina (Figura 2) [4], originando la macromolécula de AH, la cual está constituida por un núcleo de naturaleza aromática (carácter fenólico) presentando en conjunto el carácter de heteropolímero condensado (Figura 3).

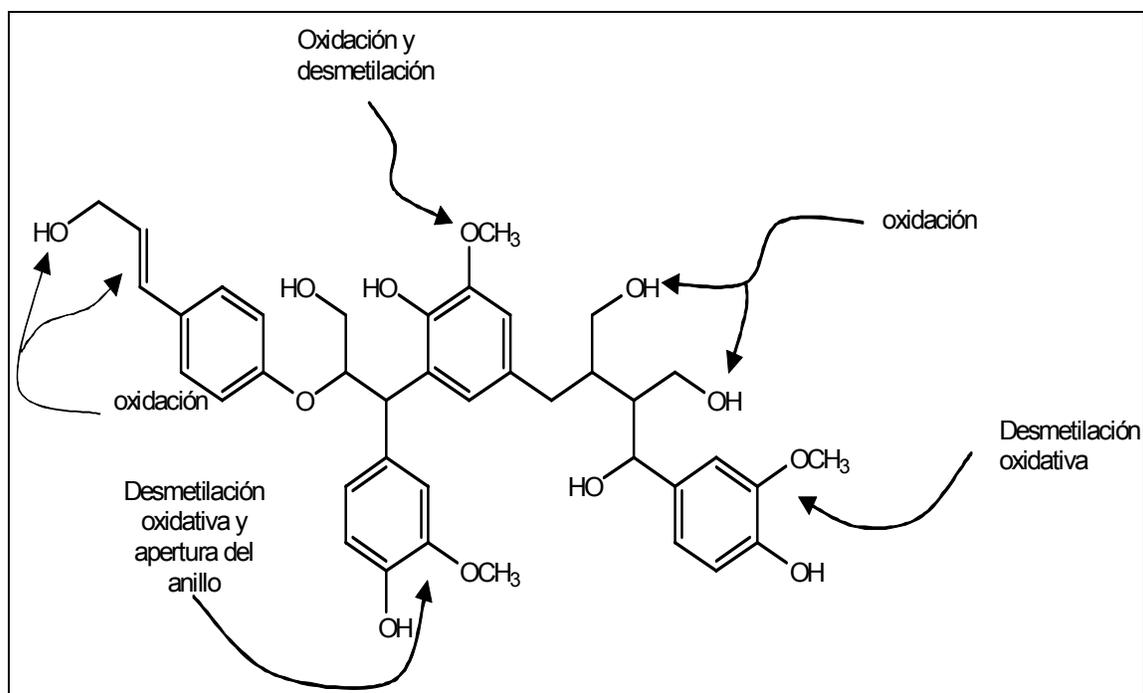


Figura 2. Modelo de construcción por bloques de AH a partir de la conversión de la lignina.

Los AHs son compuestos poliméricos que por lo tanto, a su vez están constituidos por monómeros o unidades estructurales [19-20], de los cuales, los compuestos constituyentes más comunes son aromáticos de tipo fenólico y nitrogenados, tanto cíclicos (indol, pirimidina, purinas y otros) como compuestos alifáticos (aminas, amidas, esteres, monosacáridos, aminoácidos). Los compuestos aromáticos de tipo fenólico constituyen la base o esqueleto de la molécula mientras que ciertos átomos sirven de puentes como: átomos aislados: -O-, -N=, agrupaciones elementales: -NH-, -CH₂-, o incluso el enlace puede efectuarse directamente a

través del carbono que une el sistema de anillos, proporcionando una estructura porosa y amorfa.

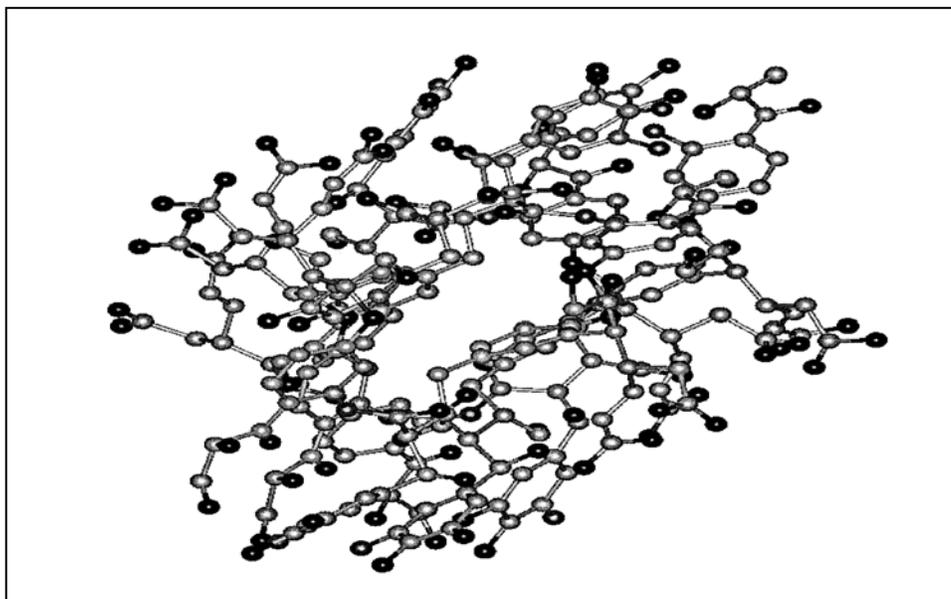


Figura 3. Modelo hipotético de la estructura de AH propuesta por Sein, Varnum y Jansen [18].

La estructura que se presentó (Figura 3) es un modelo AH helicoidal (no se presenta como una estructura compacta), en donde sus componentes tienen centros quirales que se conectan para dar una estructura de hélice hueca (centro hueco), esta estructura determina de forma significativa su capacidad de retención de agua y sus propiedades de sorción, ya que la base aromática de carbono posee propiedades hidrófobas y los radicales laterales son portadores de los grupos hidrófilos, lo que se conoce como estructura secundaria [11]. La presencia de grupos hidrófilos determina la tendencia de los AHs a formar complejos con cationes polivalentes.

A pesar del gran número de modelos propuestos por diferentes investigadores, hasta nuestros días no existe una estructura aceptada, ya que ésta depende tanto del medio en que el ácido se ha formado (localidad), como del método que se utilice para su extracción y también se sabe que estos ácidos consisten en una

mezcla heterogénea de compuestos para los cuales ninguna fórmula estructural puede ser suficiente.

2.3 PROPIEDADES Y APLICACIONES DE LOS AHs

2.3.1 Propiedades más relevantes de los AHs

Los AHs presentan una alta capacidad de intercambio catiónico, debido a la disociación de los protones de los grupos funcionales carboxílicos (-COOH) e hidrófilos fenólicos (-OH) principalmente. El protón de los grupos carboxilatos de los diversos compuestos (R-COOH) se disocian a valores de pH entre 4-6, a pH aproximadamente de 8-9 se disocian los protones de los grupos -OH del fenol y es posible también la disociación de grupos: -OH enólico, la amida (=NH) y de otros grupos funcionales, los cuales, todos contribuyen produciendo entre un 85 y 90% de la carga negativa del humus, considerando a los AHs como ácidos orgánicos de débil disociación. Adicionalmente los grupos protonados como (R-OH₂)⁺ y (R-NH₃)⁺, pueden producir cargas positivas, pero predominantemente la carga global permanece negativa [21]. Para estabilizar esa carga negativa el AH interacciona con cationes formando complejos estables y manteniendo a estos nutrientes en forma soluble y disponible para las plantas. Por lo tanto, a los AHs se les considera agentes quelatantes muy poderosos que pueden unirse a metales pesados [22], elementos radioactivos [23], pesticidas y herbicidas [24], entre otros, modificando la transferencia y fijación de los iones principalmente en los suelos (aumentando su fertilidad) y agua. Las investigaciones efectuadas sobre el tema señalan que de un 25 a 90% de esta capacidad del suelo en su horizonte superficial se debe a los AHs.

Los grupos funcionales característicos de los AHs (ácidos carboxilos e hidroxilos fenólicos), son los que confieren las propiedades ácidas, cuyo hidrógeno es susceptible a las reacciones de sustitución. Entre los diversos cationes fijados por el complejo absorbente está el protón (H⁺), es decir, la acidez o reacción de la MO viene determinada en su mayor parte por la cantidad de cationes hidrógeno fijados

en relación con los demás iones, actuando como reguladores de pH (el pH de los suelos varía entre 5.5 y 8.5, siendo el pH ideal para un suelo entre 6.0 y 7.5). Por otro lado, estos ácidos tienen gran capacidad de absorción para compuestos hidrofílicos e hidrófobos [25-26], por esta razón presentan una gran capacidad de retención de agua en una proporción de veinte veces su peso, lo cual es muy importante si se considera su uso en la remediación de suelos [27].

Todos los microorganismos requieren materia orgánica como fuente de carbono siendo los AHs la forma en la que más fácil lo toman [28]. De esta manera, promueven la actividad microbiana responsable de los procesos de mineralización, amonificación, nutrición y fijación de nitrógeno, éste último elemento, también es uno de los constituyentes de la macromolécula de los AHs y se encuentra con un porcentaje que varía en el intervalo de 3.5-5.0 %. Una parte de nitrógeno (aproximadamente la mitad) se extrae de la solución en caso de producirse una hidrólisis ácida. La cantidad de nitrógeno en los AHs está representada por amidas, mono y diaminoácidos, cuya relación es muy importante, ya que determina en cierta medida la accesibilidad de éste a los microorganismos. La mayoría de los autores señalan que el contenido de aminoácidos de los AHs de distintos suelos es en general homogéneo, aunque la capacidad de hidrolizar este elemento es distinta.

Estos compuestos orgánicos (AHs), también presentan una capacidad oxidativa y reductora (agentes redox) en los sistemas de suelo agua y sedimentos; esta característica guarda relación con la aireación (velocidad de difusión del O₂) y el pH, que también determinan la actividad microbiana. El potencial redox de los AHs afecta a aquellos elementos que pueden existir en más de un estado de oxidación (por ejemplo C, N, S, Fe, Mn y Cu), por la acción reductora principalmente de los grupos fenólicos oxidándose en quinonas. En la tabla 1 se muestra un resumen de las funciones más relevantes de los AHs en el medio ambiente. [27, 29].

Tabla 1. Participación de los AHs en procesos ambientales.

Proceso ambiental	Papel que presenta el AH
<i>Ciclo completo del carbono</i>	Transformación, transporte y acumulación del carbono
<i>Facilita el incremento térmico, color oscuro y penetración de la luz</i>	Absorción y atenuación de la radiación solar por sus grupos cromóforos
<i>Acidificación</i>	Por el protón intercambiable (H ⁺) de los grupos funcionales carboxílicos y fenólicos principalmente
<i>Fuente de nutrientes</i>	Depósito de carbono, nitrógeno, fósforo y azufre, regulan el intercambio y disponibilidad de nutrientes en la solución del suelo gracias a su CIC
<i>Incrementan la capacidad de retención de agua</i>	Por su comportamiento hidrofílico e hidrofóbico, puede interaccionar con el agua formando puentes de hidrógeno, lo que confiere una capacidad “esponja” a los suelos
<i>Metabolismo microbiano</i>	Substrato para los microbios
<i>Formación y estructura de suelos</i>	Desplazamiento de los AHs disueltos y de los metales asociados (Si, Al, Fe). Efecto de agregar sólidos de mineral sobre el suelo
<i>Metales pesados</i>	Complejación, transporte, influencia sobre la biodisponibilidad, reacciones redox. Forma complejos organo-metálicos
<i>Pesticidas, herbicidas y xenobióticos</i>	Complejación, degradación, acumulación, volatilidad y biodisponibilidad
<i>Disposición de los desechos radioactivos</i>	Complejación y transporte de los iones radionucleares en aguas subterráneas

2.3.2 Aplicaciones de los AHs

Los AHs están encontrando amplias aplicaciones en diferentes disciplinas como en medicina donde se han utilizado para cuestiones terapéuticas, como antisépticos y además se ha divulgado su actividad como antiinflamatorios [30]. En agronomía se utilizan como abonos orgánicos cuya aportación al suelo incrementa su fertilidad (mejorando la relación agua-aire, su textura, aumenta su porosidad y la cantidad de nutrientes, reduce la erosión ocasionada por el agua y el viento) y por lo tanto, su productividad [31]. En química o ingeniería ambiental se han utilizado como compuestos poliméricos para la composición de membranas para la construcción de electrodos selectivos de iones [32-34], como compuestos adsorbentes de contaminantes [35-37], catalizadores orgánicos, en la formación de hidrogeles y para muchas otras investigaciones enfocadas a las interacciones con diferentes contaminantes en el medio ambiente [38-40]. En los campos de la industria, se utilizan como aditivos de cemento, en cerámicos, en cosméticos (como faciales), entre otros [41].

2.3.3 Reactividad de los AHs como agentes complejantes de metales

En medios naturales los metales traza se encuentran implicados en una compleja serie de equilibrios que están relacionados con su biodisponibilidad. Una de las mayores dificultades que presenta el estudio de los efectos nocivos de estos metales deriva del principio fundamental en farmacología y toxicología que establece una relación directa entre la toxicidad de una especie y su biodisponibilidad. Así, existe una considerable evidencia de que la forma iónica libre de algunos de ellos es la más tóxica para la vida, mientras que sus complejos no lábiles (los que forman con ligandos orgánicos existentes en el medio) presentan una toxicidad considerablemente menor. Es evidente por tanto, que los agentes complejantes como los AHs modifican de modo significativo la forma química bajo la cual el metal está presente en el medio.

Debido a esto, uno de los mayores problemas para el estudio del comportamiento de metales traza en medios naturales radica en la complejidad de la materia orgánica presente. En cualquier reacción de los AHs con especies catiónicas influyen, tanto la heterogeneidad química como la carga variable de las mismas, por lo que estos dos efectos deben de tomarse en cuenta a la hora de hacer un estudio riguroso de los equilibrios que involucran a este tipo de sustancias. Para caracterizar el sistema AH-metal se necesitan los valores de dos variables: la concentración máxima de metal complejado y la constante de complejación. Ambos parámetros se pueden obtener al aplicar modelos básicos de complejación de una mezcla tan complicada como es el AH con el metal simulando un medio natural.

Por todo lo expuesto anteriormente, se realizaron los estudio de la estabilidad de los AHs en sólido y solución acuosa mediante el análisis y caracterización continua de las soluciones, empleando diferentes técnicas analíticas y evaluando la forma en que la estabilidad se ve favorecida o afectada por los procesos de interacción *AH – metal*.

2.4 MÉTODOS Y TÉCNICAS ANALÍTICAS GENERALES PARA EL ANÁLISIS Y CARACTERIZACIÓN DE LOS AHs

Sin duda, las investigaciones de los AHs han alcanzado un evidente interés en la época actual, gracias sobre todo a la aplicación de nuevos métodos y técnicas de investigación que permiten descubrir e identificar sus diferentes características, utilizando pequeñas cantidades de muestra y empleando diferentes metodologías rápidas, sencillas y económicas que puedan asegurar la buena calidad de los estudios realizados. En la Tabla 2, se presenta una descripción de diversos métodos analíticos específicos para la caracterización estructural de los AHs en solución acuosa [42].

Tabla 2. Métodos comunes para la caracterización de los AHs.

Método	Información
Químico/Físico	
Análisis elemental	Composición elemental (C, H, N, O, S)
Derivatización: (metilación, silylación)	Grupos funcionales (-OR, -OOR)
Titulaciones ácido/base	Capacidad de intercambio catiónico, AT y cantidad de grupos funcionales (-COOH y -OH)
Degradación termal (pirólisis)	Degradación de productos (monómeros), en combinación con CG/MS, CL/MS, o MS
Degradación oxidativa-reductiva	Degradación de productos (monómeros), en combinación con CG/MS o CL/MS
Microscopia	Tamaño, forma
Viscometria	Tamaño, forma
Espectroscopia	
UV/Vis	Determinación de grupos por absorción-UV/Vis (A(280nm) y A(465-665nm)); cociente E4/E6
IR, IRTF	Determinación cualitativa de grupos funcionales
Fluorescencia	Determinación cualitativa de grupos fluorescentes
RMN (¹ H, ¹³ C)	Determinación cuantitativa de grupos funcionales: aromáticos, alifáticos, carbohidratos
RMN (2-D, ¹ H, ¹³ C)	Determinación cualitativa/cuantitativa de unidades monoméricas y patrón de sustitución
RMN (¹⁵ N)	Determinación cualitativa de elementos estructurales
Raman	Determinación cualitativa de grupos funcionales
REP	Determinación cuantitativa de radicales orgánicos y metales de transición paramagnéticos
MS	Determinación de moléculas orgánicas; en combinación con otros métodos (métodos físico-químicos degradativos: pirólisis-CG/MS, hidrólisis-CG/MS, oxidación-CG/MS)

Tabla 2. Métodos comunes para la caracterización de los AHs (*continuación*).

Método	Información
Cromatografía EC	Pesos moleculares, tamaño
Cromatografía en gel	
Separación RP-C18	Hidrofobicidad
Modelos de reacción en combinación con algún método seleccionado	
<i>Fluorescencia/amortiguamiento</i>	Interacción con micro-contaminantes orgánicos (pesticidas, herbicidas), metales
<i>Químico/hidrólisis enzimática</i>	Determinación de aminoácidos, ácidos orgánicos de cadenas cortas, monosacáridos
<i>Biológico/degradación</i>	Degradación con microorganismos (utilización biológica)
<i>Adsorción/comportamiento</i>	Adsorción en fase sólida (carbón activado, fases minerales)

Es importante mencionar que realizar la caracterización de los AHs de una forma muy elemental, es decir utilizando uno o dos de los métodos o técnicas de análisis, puede ser insuficiente debido a la complejidad estructural de estas sustancias; lo ideal y recomendable es aplicar diferentes métodos independientes para su caracterización y obtener varios resultados de referencia que nos garanticen de una forma más acertada y concreta la composición estructural de los AHs y concluir en puntos más exactos y confiables.

2.5 MÉTODOS DE EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO DE LOS AHs

La extracción es el primer paso para aislar a los AHs de la MO antes de su caracterización, realizando la extracción de una forma en la que resulte lo menos alterada la molécula del ácido y evitando la co-extracción de otro tipo de sustancias con características no húmicas tales como carbohidratos, grasas y aminoácidos que van a interferir en su correcto análisis. Esta etapa es fundamental, tanto así, que la clasificación de las sustancias húmicas depende de los productos obtenidos durante la extracción; así, la clasificación de las SHs

mencionada anteriormente (Hs, AFs y AHs) fue hecha con respecto a su solubilidad, tal como se muestra en la Figura 4. Los AHs y los AFs representan la fracción soluble al extraer con álcali, mientras que las Hs representan el residuo insoluble del humus. Los AHs son separados de los AFs a través de la precipitación, lo cual se logra mediante la acidificación de la solución acuosa, permaneciendo los AFs en solución [5-31].

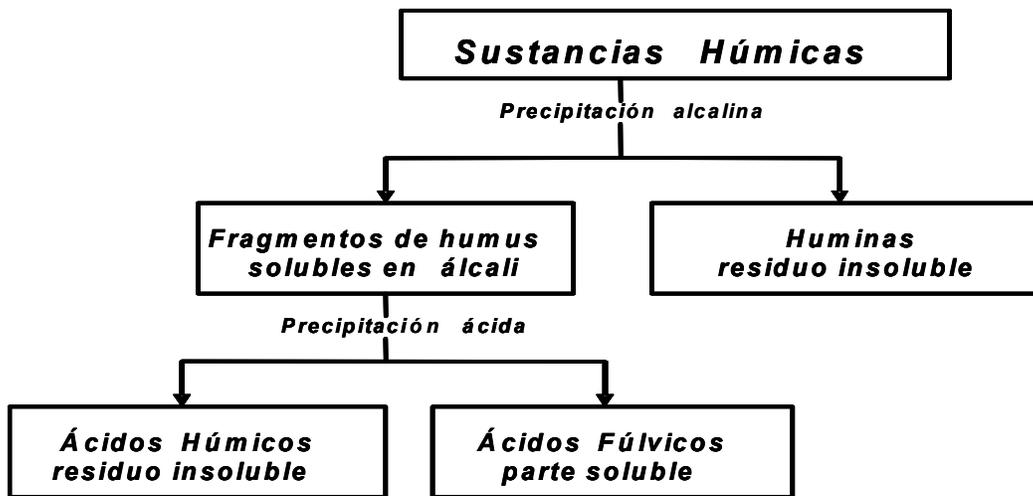


Figura 4. Clasificación de las SHs con base en su solubilidad en medios alcalinos y/o ácidos.

Como ya se mencionó los procedimientos de extracción representan la fase más crítica en el estudio de los AHs, a pesar de que se han estado estudiando intensamente desde hace más de dos siglos. El extractante ideal debe solubilizar estas sustancias sin producir cambios en su estructura molecular y propiedades [29]. Según Stevenson, el método de extracción idóneo debe cumplir o tomar en cuenta los siguientes objetivos [9].

1. El método a utilizar para la extracción de los AHs, debe llevarse a cabo con la menor alteración química posible.
2. Los AHs extraídos deben estar libres de impurezas inorgánicas como pueden ser arcillas y cationes polivalentes.

3. La extracción se puede considerar completa si el peso molecular medio de la fracción obtenida es representativo de la muestra.
4. El método debe ser universal para cualquier tipo de sustrato.

Como se puede observar, se presenta una serie de condiciones que debemos de tomar en cuenta al llevar a cabo la extracción. Demostrando con ello que la extracción de los AHs es un problema que aún no se ha resuelto. Según las características de cada material (turba, leonardita, estiércol, entre otros), hay que adaptar el método de extracción buscando un rendimiento máximo en la obtención de dichas sustancias, pero a la vez minimizando la posible interferencia de otros componentes.

2.5.1 Factores que influyen en la extracción de los AHs

2.5.1.1 Concentración y tipo de extractante

Uno de los parámetros que influye de modo significativo e importante en la solubilidad de las SHs es el tipo de extractante, sin embargo, de todos los extractantes empleados, el NaOH 0.1 M es el más utilizado, ya que permite obtener altos rendimientos, posteriormente, se encuentra el $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ 0.1 M que se ha utilizado para la solubilización de SHs consiguiendo generalmente un rendimiento menor de extracción que con los extractantes alcalinos. Otro extractante empleado con frecuencia es la mezcla de NaOH- $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ a concentración 0.1 M, la cual se ha utilizado tanto para suelos como para turbas.

Por otro lado, la apropiada concentración del extractante también ha representado objeto de numerosos estudios, utilizando con mayor frecuencia el NaOH con la concentración 0.1 M, si bien algunos investigadores han utilizado la concentración 0.5 M, e incluso, hay quienes han experimentado la concentración 1 M pero en este caso con KOH.

La extracción de las SHs de los suelos, en la actualidad se lleva a cabo con el empleo de diversos extractantes como se puede observar en la Tabla 3 [1]. Las soluciones de sales neutras de ácidos minerales, en particular el pirofosfato de

sodio, así como de algunas sales neutras de ácidos orgánicos (por ejemplo, sales sódicas de los ácidos oxálico, tartárico, cítrico y otros) para la extracción de las SHs, están basadas en la capacidad que presentan para formar precipitados insolubles o complejos solubles con calcio, hierro, aluminio y algunos otros cationes polivalentes, con los cuales están unidos en el suelo las SHs.

Tabla 3. Extractantes de SHs comúnmente utilizados.

Extractante	% aproximado de SHs extraídas
Base fuerte:	
NaOH	80
Sales neutras:	
Na ₄ P ₂ O ₇ , Na ₂ CO ₃ , NaF	30
Sales de ácidos orgánicos	30
Acetilacetona	30
Ácido fórmico	55
Acetona-H ₂ O-HCl	20

Si bien el procedimiento tradicional para la extracción de AH es el que emplea una base fuerte como el NaOH, éste tiene el inconveniente de llevarse a cabo mediante una descalcificación previa con soluciones diluidas de ácidos minerales (HCl o H₂SO₄). Por el contrario, la extracción con Na₂P₂O₇ · 10H₂O (0.1 M) transcurre en tiempos cortos (10-12 h) con soluciones de Na₂P₂O₇ · 10H₂O o con una mezcla de Na₂P₂O₇ · 10H₂O + NaOH a pH ≈ 13. Con un sólo tratamiento del suelo con esta solución (Na₂P₂O₇ · 10H₂O + NaOH) el rendimiento de las SHs es próximo a la cantidad que se obtiene por el método con NaOH [1, 43, 44]. Así, el método del pirofosfato excluye el prolongado proceso de descalcificación (sobre todo en el caso de suelos carbonatados) y los tratamientos repetitivos del suelo cuando se utiliza la solución de NaOH 0.1 N.

2.5.1.2 Relación de extracción

Otro de los factores que puede afectar la solubilidad de las SHs es la relación de extracción (P/V), que relaciona el peso de sustrato y el volumen utilizado del agente extractante, influyendo en la concentración de las SHs líquidas que pueden obtenerse en el proceso de extracción. Mientras que para los suelos la relación

P/V recomendada por la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (por sus siglas en inglés IHSS) es de 1/10 como relación de extracción aplicable al aislamiento de SHs [45]. Para otros materiales (turba, estiércol, leonardita) puede ser necesario un aumento de la proporción del extractante, sobre todo, cuando pueda esperarse una elevada solubilidad de materiales que sobresature la disolución antes de que se extraigan todas las SHs, debido a esto, se reportan distintos valores de la relación P/V utilizando como sustrato diferentes materiales (estiércol, turba y suelos calizos pobres en MO) y volumen del agente extractante.

2.5.1.3 Tiempo de extracción

El tiempo utilizado en la extracción es otro de los factores que también ha sido objeto de muchas investigaciones y que va a depender del material orgánico. Se ha observado que a medida que aumenta el tiempo de extracción desde 0.5 hasta 24 h también lo hace el porcentaje de carbono extraído. Otros investigadores han utilizado un tiempo total de 24 h tanto para materiales no humificados como para materiales altamente humificados tales como turbas y lignito. Por otro lado, según el método recomendado por la IHSS para la extracción de SHs es de 4 h, que viene siendo el tiempo suficiente para solubilizar la mayor parte de los SHs presente en los suelos.

2.5.1.4 Temperatura de extracción

En materiales ricos en materia orgánica (estiércol, turba, lignito y composta), el rendimiento de extracción dependerá en gran medida de las condiciones en las que se trabaje, siendo la temperatura un factor relevante [46]. En general, todos estos estudios demuestran que el incremento de temperatura durante la extracción independientemente del sustrato y del agente extractante utilizado incrementa el rendimiento de extracción.

2.5.2 Factores que influyen en el fraccionamiento de los AHs

El principal objetivo que se persigue cuando se fracciona los extractos de SHs es reducir su heterogeneidad para facilitar la aplicación de las distintas técnicas analíticas, que a su vez se basan en la separación de sus componentes aprovechando alguna propiedad relacionada con su composición molecular. Como se pudo observar se han empleado diferentes procedimientos para el fraccionamiento de las SHs contenidas en la materia orgánica soluble (MOS), siendo el método más utilizado el que se basa en la variación del pH por el medio alcalino/ácido. Por otro lado, es importante mencionar que algunos investigadores introducen una modificación en la metodología convencional para fraccionar los materiales húmicos, cuyo objetivo es para distinguir dos fracciones la no humificada (NH) y los verdaderos AFs y AHs. Tal fraccionamiento se efectúa mediante el uso de un gel de resina de polivinilpirrolidona (PVP) empaquetado en columna, a través del cual se hace pasar la fracción de SHs, de tal manera que la componente NH atraviesa la columna mientras que los AFs y AHs quedan adsorbidos o retenidos debido a sus características fenólicas. Este tipo de columnas empaquetadas muestran cómo la resina de PVP forma puentes de hidrógeno principalmente con grupos fenólicos, hidroxilos y carboxilos (Figura 5), mientras que la fracción no adsorbida (NH) está constituida principalmente por carbohidratos, péptidos, aminoazúcares, aminoácidos y otros compuestos de naturaleza no húmica.

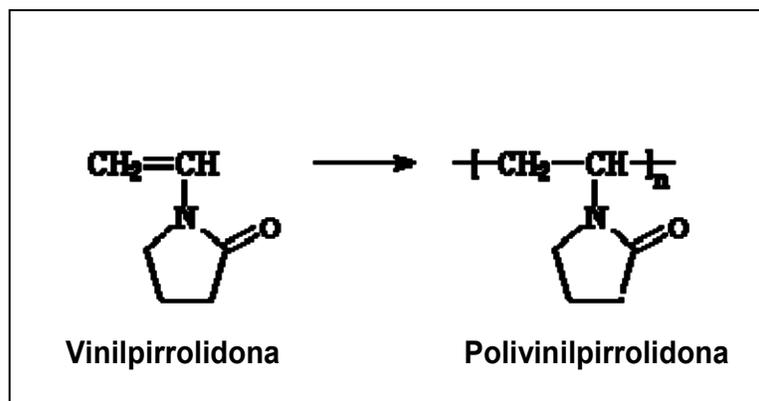


Figura 5. Estructura básica de la resina de polivinilpirrolidona.

Otras técnicas de fraccionamiento utilizadas se fundamentan en las diferencias en el tamaño molecular. Puede citarse al respecto la cromatografía de elución sobre gel, la ultrafiltración y la ultracentrifugación [47-50], siendo éstas dos últimas aplicables también tanto para la concentración como para la purificación de los AHs basadas en la carga eléctrica de las moléculas. Por otro lado, se han utilizado otras técnicas como la electroforesis de isoelectroenfoco y la isotacoforesis.

2.5.3 Métodos y técnicas de purificación de los AHs

En lo que se refiere a la purificación de los AHs se tiene como finalidad la eliminación de carbohidratos, proteínas, lípidos, compuestos orgánicos de bajo peso molecular y sales minerales, que son co-extraídas con los mismos antes de proceder a su caracterización.

El uso de mezclas de ácidos minerales como HCl-HF ha sido propuesto por numerosos autores, con el fin de eliminar los componentes minerales de los AHs extraídos tanto de suelos como de carbones fósiles o de cualquier otro tipo de material. La efectividad del método se basa en la utilización del HF, debido a su capacidad para disolver minerales arcillosos hidratados y formar complejos con cationes di- y trivalentes, según esta técnica, tanto compuestos orgánicos de bajo peso molecular como parte de las sales minerales son eliminados durante el proceso, con el inconveniente de que ni los metales fuertemente adsorbidos o complejados ni muchos hidróxidos pueden ser del todo separados.

Por otro lado, las impurezas de naturaleza orgánica (carbohidratos, proteínas, entre otros) son el otro tipo de interferentes que pueden ser co-precipitados o co-adsorbidos junto con las SHs, estos compuestos podrían estar ligados covalentemente a la estructura de los AH puesto que para su eliminación tienen que ser empleados métodos de separación bastante exhaustivos. La eliminación de lípidos como grasas, ceras, resinas, entre otros, se puede llevar a cabo con disolventes tales como el éter o mezclas alcohol-benceno, también ha sido usada la ebullición de los AH en agua para la eliminación de polisacáridos, polipéptidos y

pequeñas cantidades de ácidos fenólicos y aldehídos. Una opción muy generalizada para la purificación de AHs es someterlo a diálisis con una disolución de agua desionizada hasta que esté libre de iones cloruro, sodio y potasio, y seguido de una posterior liofilización [51].

Los procesos de re-extracción como método de purificación no son muy mencionados en la literatura, pero se le considera otro de los procesos de purificación, para eliminar todos aquellos compuestos que interfieren en el buen análisis y caracterización de los AHs.

2.6 ESTUDIOS DE ESTABILIDAD Y DEGRADACIÓN CINÉTICA EN LA MACROMOLÉCULA DE LOS AHs EN SÓLIDO Y SOLUCIÓN ACUOSA

Los estudios que se han realizado acerca de los AHs son basados principalmente en su estructura, sus mecanismos de complejación (con metales, xenobióticos, halógenos y elementos radioactivos), propiedades ácido-base, óxido-reducción, entre otros. Sin embargo, estos reportes no son completamente claros a la vez que no hacen mención acerca de un hecho fundamental: la baja estabilidad de los AHs en solución y el resultado que esto tiene en su estudio. Son escasos los reportes acerca del efecto que presenta con diversas variables (temperatura, radiación, aire, pH, método de extracción entre otros) [52-53] sobre la estabilidad y cómo estos juegan un papel importante en la interacción con especies contaminantes (reactividad) [54], a pesar de su importancia en sistemas medioambientales (complejación/descomplejación, adsorción/desorción, agregación/desagregación, oxidación/reducción, entre otros) [55].

2.6.1 Efecto del pH

Entre los factores que afectan la estabilidad de los AHs en solución acuosa se puede citar el pH, el cual está relacionado con el grado de disociación y

desprotonación de sus grupos carboxílicos y fenólicos (-COOH y -OH) [56, 57], aumentando la polaridad del material húmico y alterando su estructura. Tales procesos de formación de cargas negativas pueden explicar el incremento de la CIC produciendo probablemente entre un 85 y 90% de la carga negativa del humus. Es importante analizar el efecto que presenta la molécula del AH, porque no sólo se está llevando a cabo una desprotonación y protonación de sus grupos funcionales característicos, sino también una serie de reacciones al tratarlo con álcali (NaOH).

2.6.2 Efecto del calentamiento

Como ya se ha mencionado anteriormente, todas las propiedades químicas y físicas que presentan los AHs se deben a su composición estructural, por esta razón, se ha encontrado una característica particular para la macromolécula de AH llamada temperatura de transición vítrea o Tg, que se define como la capacidad del AH para absorber calor, aumentar su temperatura y evaporar o eliminar compuestos (agua química o impurezas), proporcionando una mayor movilidad e interacción con los metales [58-59]. Para su determinación se han utilizado diferentes técnicas termoanalíticas como CDB y ATG. Ambas técnicas permiten obtener parámetros químicos y físicos (entalpías, porcentaje de pérdida en peso por la eliminación de agua química y moléculas pequeñas) de estos compuestos en función de la temperatura. Otro parámetro importante es observar mediante los termogramas que tan estables son los AHs y que grado de aromaticidad presentan.

La Tg se manifiesta en los AHs debido a su estructura amorfa, es decir, sus cadenas no están dispuestas según un ordenamiento cristalino sino que están esparcidas en cualquier ordenamiento aún en estado sólido. Este tipo de estudio fue utilizado para determinar la temperatura máxima de los AHs antes de su degradación total (mineralización) con el fin de desarrollar y verificar modelos estructurales que puedan emplearse más a fondo para predecir interacciones moleculares con los contaminantes en el medio ambiente [60].

2.6.3 Efecto de la radiación

La capacidad de absorción de la radiación ultravioleta visible (RUV) por los AHs puede desencadenar alguno de los procesos siguientes: fotodegradación, fotomineralización o fotopolimerización (Figura 6) [61-62].

La fotodegradación del AH es la pérdida de la capacidad para absorber fotones como resultado de la degradación de sus grupos cromóforos por acción de la RUV. Esto es, el AH pierde color y aumenta la transmisión de la radiación.

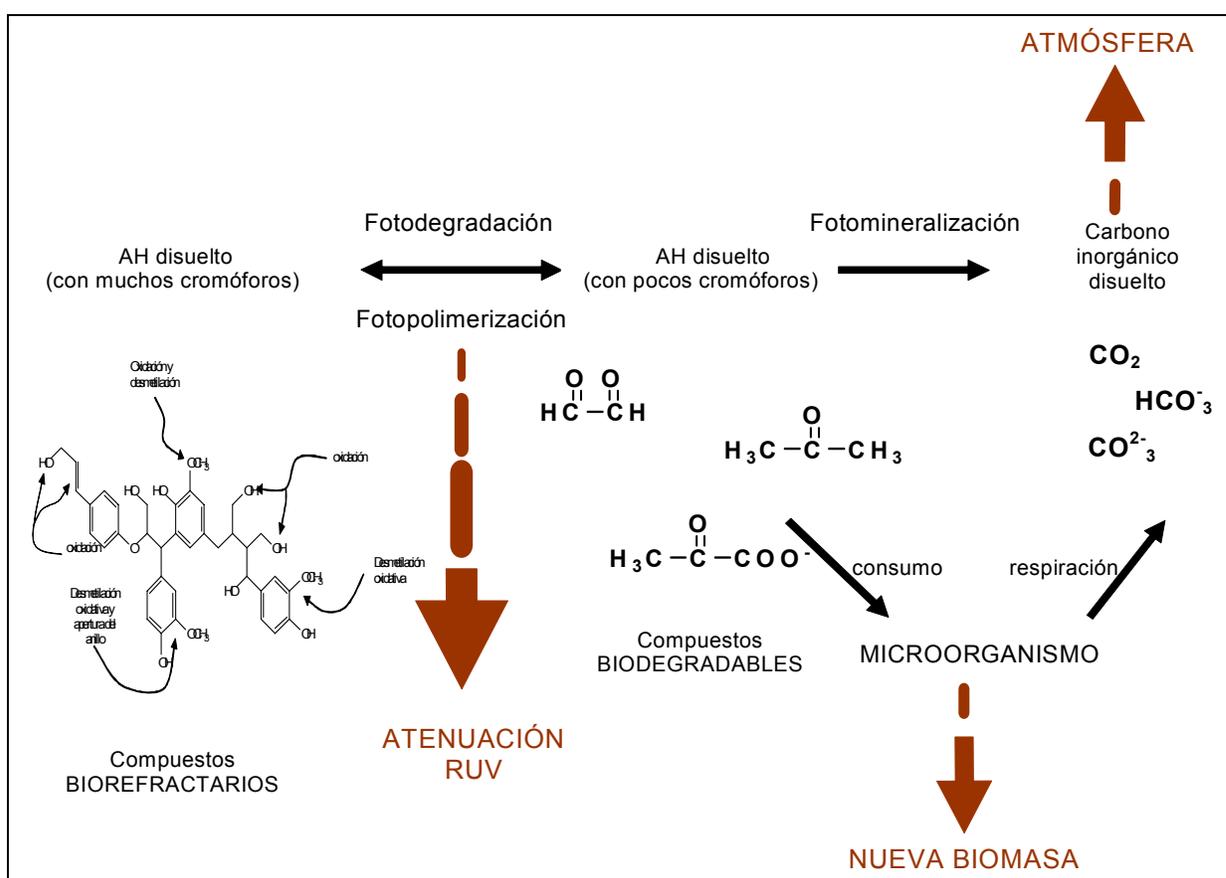


Figura 6. Interacción del AH por la radiación UV/Vis y las implicaciones ambientales que se derivan

Bajo ciertas circunstancias relacionadas con la composición del AH, se puede desencadenar el proceso contrario, la formación de cromóforos. A este proceso se le denomina fotopolimerización o fotohumificación y puede contrarrestar la

penetración de la RUV en los suelos o en el agua. Por último, la fotomineralización es la conversión abiótica de moléculas de carbono orgánicas a inorgánicas como resultado de la absorción de los fotones de la radiación. Este proceso tiene una menor relevancia desde el punto de vista de la atenuación de la radiación, aunque tiene potenciales implicaciones para la emisión de dióxido de carbono (CO₂) hacia la atmósfera o a través de los microorganismos.

Se hace hincapié, que la estabilidad de los AHs es una característica fundamental y poco abordada en la literatura, no obstante que compromete la gran cantidad de aplicaciones que presentan en los diferentes campos, por esta razón, se realizó la caracterización de un AH obtenido directamente de un suelo mediante una extracción con pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio como agente extractante. Esto nos permitirá la comparación entre las estabildades de los diferentes AHs (comerciales y extraídos en nuestro laboratorio) con características distintas.

Por otro lado, se plantean estudios de estabilidad realizando experimentos encaminados a determinar el efecto que tienen los procesos de solubilización-reprecipitación del AH sobre su estructura, tomando en cuenta que la extracción con álcali produce importantes modificaciones estructurales. De igual forma, pero en lo que concierne al efecto del pH sobre la estabilidad del AH por titulaciones ácido/base de dichas sustancias, con el fin de determinar el comportamiento del AH en términos de la variación de acidez de la solución. Todo esto redundará en un mejor análisis de los factores que afectan la estabilidad de estas moléculas y con base en todo lo anterior se prosigue a plantear los objetivos del presente trabajo.

Capítulo 3. Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar y analizar la estabilidad de los ácidos húmicos (AHs) aplicando diferentes métodos y técnicas analíticas para conocer sus modificaciones estructurales.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Extraer, purificar y caracterizar AH de una muestra de suelo, utilizando una mezcla de $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ - NaOH como agente extractante.
- Comparar las propiedades fisicoquímicas de AHs de diferente procedencia mediante diversas técnicas analíticas.
- Analizar el efecto de acidificación en la macromolécula del AH mediante titulaciones espectro-potenciométricas.
- Analizar el efecto en el proceso de solubilización y precipitación en la funcionalización y estabilidad del AH por medio de re-extracciones continuas.
- Analizar el efecto en el proceso de solubilización y precipitación en la capacidad de complejación del AH hacia los iones metálicos Cu(II) y Pb(II).
- Correlacionar la estabilidad y reactividad de los diferentes AHs con los cambios estructurales observados.

Capítulo 4. Metodología experimental

4. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

En el presente apartado están descritos los diferentes métodos y técnicas analíticas de estudio, inicialmente para la extracción de un AH de una muestra de suelo, para la caracterización y comparación de los diferentes AHs (comerciales y extraídos) que se emplearon para este trabajo. Por otro lado, se describen cada unos de los procesos que afectan la estabilidad de la molécula de AH que es el efecto del pH y el efecto de la solubilización y precipitación por medio de re-extracciones continuas, en esta parte se incluyen las cinéticas en solución y análisis termo-espectroscópicos. Finalmente, se plantea el procedimiento para la obtención de las constantes de equilibrio de complejación con los metales tóxicos: Cu (II) y Pb (II). Como a continuación se describe cada uno de ellos:

4.1. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ÁCIDO HÚMICO PROVENIENTE DE SUELO (AH-S)

Una muestra de suelo proveniente de Atotonilco el Grande (Hidalgo) se preparó mediante un proceso de secado y tamizado con una malla de 1.0 mm de tamaño de partícula para la extracción del AH. Se pesaron 15 g y se transfirieron a un matraz erlenmeyer con capacidad de 250 mL. Posteriormente, se agregaron 120 mL de una solución recién preparada de $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e NaOH, (11.15 g de $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ y 1 g de NaOH en 250 mL de solución) a $\text{pH} \approx 13$; el matraz se cerró perfectamente con una septa para evitar la entrada de CO_2 y se mantuvo en agitación durante 30 min después de lo cual, se dejó reposar toda la noche para finalmente filtrar utilizando papel filtro Whatman No. 42. Al filtrado obtenido se le añadió aproximadamente 1.5 mL de HCl concentrado, se agitó cuidadosamente y se dejó reposar hasta observar la precipitación del AH. La mezcla se filtró a vacío utilizando membranas Millipore de tipo GVHP 0.22 μm . El sólido se secó en la estufa a una temperatura de 80°C durante 2 h aproximadamente; se retiró y se

colocó en el desecador alrededor de 30 min y finalmente se pesó [1, 63]. Para la caracterización del AH-S extraído se siguen los procedimientos descritos y desarrollados a continuación.

4.2 CARACTERIZACIÓN DE LOS AHs COMERCIALES (AH-LE Y AH-L) Y DEL AH EXTRAÍDO (AH-S)

En el presente apartado están descritos los diferentes métodos y técnicas analíticas para la caracterización de los AHs (provenientes de la leonardita, lignina y suelo) que se emplearon para este trabajo de investigación. A continuación se describe cada uno de ellos:

4.2.1 Análisis elemental

Se realizó el análisis elemental de las muestras de los diferentes AHs con la finalidad de comparar y discutir si hay alguna variación en cuanto a sus propiedades y composición elemental (valores reportados: C 50-60%, O 30-40%, H 4-6%, N 1-6% y S 0.1-0.5%) [27].

Por lo consiguiente, para la determinación de la composición elemental de las muestras sólidas de AHs, se utilizó un Analizador Elemental Serie II CHNS/O 2400 Perkin Elmer, que permitió determinar los porcentajes totales de los componentes elementales (%C, %H, %N y por diferencia %O) y las relaciones: H/C y O/C con base en la relación de sus átomos.

4.2.2 Determinación de carbono orgánico (CO), carbono inorgánico (CI) y carbono total (CT)

(a) Determinación de CO

La cuantificación de materia orgánica en suelo, agua, sedimentos y durante las diferentes etapas de extracción de las SHs, se obtiene a través del contenido de

CO con el método de Walkley y Black [64]. El análisis volumétrico consiste en la oxidación con dicromato de potasio ($K_2Cr_2O_7$) en un medio fuertemente ácido hasta la formación de CO_2 , según las siguientes ecuaciones:



La cantidad de oxígeno utilizado para oxidar el carbono orgánico se determina por la diferencia entre la cantidad de $K_2Cr_2O_7$ requerido en la oxidación y la que quedó después de ésta, usando para este fin la titulación con solución de sal de Mohr (sulfato ferroso amoniacal ($Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$); también se adiciona H_3PO_4 para evitar interferencias con el catión Fe^{3+} .

Procedimiento:

1. Pesar 10 mg de AH seco y colocarlo en un matraz erlenmeyer de 125 mL, por triplicado. Realizar también un blanco.
2. Adicionar exactamente 10 mL de $K_2Cr_2O_7$ 0.166 M ó 1 N girando el matraz cuidadosamente para que entre en contacto con todo el AH.
3. Agregar cuidadosamente 20 mL de H_2SO_4 concentrado a la suspensión, girar nuevamente el matraz y agitar de esa forma durante un minuto.
4. Dejar reposar durante 30 min en la campana de extracción.
5. Añadir 5 mL de H_3PO_4 concentrado.
6. Adicionar 5 gotas del indicador difenilamina.
7. Titular con disolución de $Fe(NH_4)_2(SO_4) \cdot 6H_2O$ 1N gota a gota hasta un punto final de color verde.

El porcentaje de CO se calculó utilizando la siguiente ecuación:

$$\%CO = (V_b - V_m / g_{(muestra)}) \times N \times (12 / 4000) \times 100 \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 1)$$

Donde: V_b y V_m representan el volumen gastando de $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2 (\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en la titulación del blanco y la muestra; y N es la normalidad del mismo.

(b) Determinación de CT

La determinación de CT se evalúo con el método reportado por M. Amato [65], El método se basa en la oxidación de CO y CI del AH por medio de una mezcla crómica, liberando el CO_2 de la muestra siendo absorbido en NaOH, posteriormente, se valora el exceso de NaOH con HCl 0.5 N y finalmente el NaHCO_3 formado con HCl 0.01 N. Como a continuación se describe:

Procedimiento:

1. Pesar 10 mg de AH seco y colocarlo en un tubo de ensayo grande con las siguientes características: l = 25 cm y d.i.= 2.5 cm. Hacer por triplicado y también un blanco.
2. Adicionar exactamente 20 mL de mezcla crómica (180 mL de H_2SO_4 , 120 mL H_3PO_4 y 20 g de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$).
3. Colocar cuidadosamente un tubo de ensayo dentro del tubo grande con 20 mL de NaOH 1 N como se muestra en la Figura 7.
4. Tapar el tubo grande con una septa y dejar reposar durante 24 h a una temperatura entre 110 y 130 °C en un baño de arena.
5. Retirar el tubo que contiene el NaOH, tomar 5 mL y transferirlos a un matraz erlenmeyer de 125 mL.
6. Agregar 40 mL de agua destilada.
7. Adicionar dos gotas de indicador de fenolftaleína y titular con HCl 0.5 N hasta un punto final transparente.
8. Adicionar dos gotas del indicador de anaranjado de metilo y titular con HCl 0.01 N hasta un punto final rojo.



Figura 7. Esquema para la determinación de CT.

Para el cálculo de CT se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%CT = ((V_m - V_b) \times 4 / g_{\text{(muestra)}}) \times M \times (12 / 1000) \times 100 \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 2)$$

Donde: V_m y V_b representan el volumen gastando de HCl 0.01 N en la titulación del blanco y muestra; y M es la molaridad del ácido.

(c) Determinación de CI

Para corroborar los resultados obtenidos de CO y CT en las muestras de AH, se realizó la determinación de CI de la misma forma que el método anterior de CT, basado en la oxidación de CI del AH por medio de una disolución de HCl, liberando CO_2 de la muestra siendo absorbido en NaOH, finalmente se valora el exceso de NaOH con HCl 0.05 N y el NaHCO_3 formado con HCl 0.01 N. Como a continuación se describe:

Procedimiento:

1. Pesar 10 mg de AH seco y transferirlo al frasco 1 (figura 8). Hacerlo por triplicado. Utilizar un blanco.
2. Adicionar exactamente 20 mL de NaOH 1 N en el frasco 2.
3. Introducir el frasco 1 y el frasco 2 a otro frasco grande de boca ancha y cerrar con una tapa con septa, como se muestra en la figura 8.
4. Adicionar 5 mL de HCl 2 N al frasco 1, introduciendo una aguja en la septa.
5. Dejar reposar durante 24 h.

6. Retirar el frasco que contiene el NaOH, tomar 5 mL y transferirlos a un matraz erlenmeyer de 125 mL.
7. Agregar 40 mL de agua destilada.
8. Adicionar dos gotas de indicador de fenolftaleína y titular con HCl 0.5 N hasta un punto final transparente.
9. Adicionar dos gotas del indicador de anaranjado de metilo y titular con HCl 0.01 N hasta un punto final de color rojo.

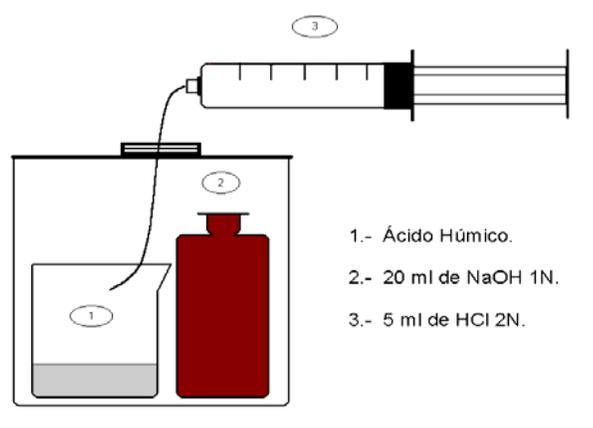


Figura 7. Esquema para la determinación de Cl.

Para el cálculo de Cl se utilizó la siguiente ecuación:

$$\%Cl = ((V_m - V_b) \times 4 / g_{(muestra)}) \times M \times (12 / 1000) \times 100 \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 3)$$

Donde: V_m y V_b representan el volumen gastando de HCl 0.01 N en la titulación del blanco y muestra, y M es la molaridad del ácido.

4.2.3 Determinación del contenido de cenizas

Para la determinación de cenizas, se lavaron rigurosamente los crisoles, se colocaron en la mufla a 800 °C (aproximadamente 2 h), hasta peso constante. Posteriormente, se pesó 0.1 g de cada uno de los AH en los crisoles (por triplicado) y se dejaron en la mufla a 900 °C durante 6 h. Finalmente, los crisoles se colocaron en un desecador y se llevaron a peso constante.

4.2.4 Espectroscopía UV/Vis

Las propiedades espectroscópicas como la absorptividad molar (ϵ_{280}) a 280 nm, porcentaje de aromaticidad y peso molecular promedio de los AHs, se determinan por su estructura química, es decir, considerando la gran cantidad de grupos aromáticos y cadenas alifáticas con dobles enlaces conjugados donde ocurren las transiciones π - π^* a la longitud de onda \approx 280 nm.

Para los estudios por espectroscopia UV/Vis se utilizó un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 40. Cabe mencionar que para la realización de estos estudios se probaron diferentes diluciones a partir de la solución madre de AH de 1000 ppm (10 mg de AH en 360 μ L de NaOH y se aforó con agua desionizada hasta 10 mL) para obtener el factor de dilución adecuado en donde se obtuvieran absorbancias adecuadas. Con el factor de dilución 1 en 100 se corrieron los espectros de 200 a 700 nm, registrando las absorbancias a diferentes longitudes de onda (280, 465 y 665 nm) y determinando el coeficiente de absorptividad molar (ϵ_{280}), utilizando la ecuación de Lambert-Beer:

$$\text{Absorbancia} = \epsilon c l \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 4)$$

Donde: ϵ es el coeficiente de absorptividad molar cuyas unidades son: ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), c es la concentración con base en CO del AH y l es la longitud de la celda.

El Porcentaje de aromaticidad y el peso molecular promedio de los AHs se calcularon utilizando las siguientes ecuaciones [66]:

$$\text{Aromaticidad} = 0.05 \epsilon_{(280)} + 6.74 \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 5)$$

$$\text{P.M.} = 3.99 \epsilon_{(280)} + 490 \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 6)$$

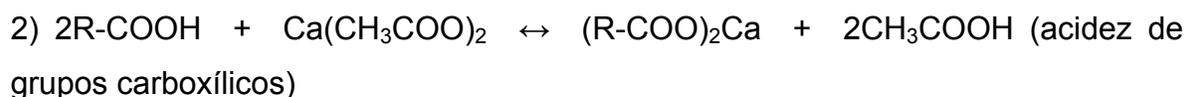
Entre los parámetros obtenidos mediante la absorción en el UV/Vis está la relación E_4/E_6 (absorbancia de 465 nm dividida por la absorbancia de 665 nm) [66], la cual se ha utilizado (principalmente por ingenieros agrónomos y científicos de suelos) para correlacionar el grado de aromaticidad (indicador de humificación) y peso molecular promedio de las moléculas.

4.2.5 Determinación de la acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos

Por la presencia de grupos carboxílicos e hidróxilos fenólicos principalmente en la macromolécula de los AHs, se determinan las propiedades ácidas y la capacidad de intercambio iónico de dichos ácidos. La determinación de grupos funcionales comunes cuyo hidrógeno es susceptible a las reacciones de sustitución (protón intercambiable) se realiza por titulaciones potenciométricas, ya sea empleando $\text{Ba(OH)}_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ (acidez total) o $\text{Ca(CH}_3\text{COO)}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (acidez de grupos carboxílicos), llevándose a cabo las siguientes reacciones químicas según Schnitzer [29, 67, 68]:



Donde: **R** es la macromolécula, **H** es el protón intercambiable de los grupos ácido -COOH o de los grupos -OH de fenoles. El Ba(OH)_2 en exceso al final de la reacción es titulado con una solución de HCl.



El ácido acético (CH_3COOH) liberado durante la reacción es titulado con solución de NaOH.

La acidez total de los AHs (grupos carboxílicos e hidróxilos fenólicos), se determinó por el método de Ba(OH)₂ (barita cáustica) a pH > 13, llevando a cabo la titulación potenciométrica indirecta, basada en la disociación parcial de los protones (H⁺) de los grupos ácido [69-70].

Procedimiento:

1. Pesar 50 mg de AH seco y colocarlo en un matraz erlenmeyer de 125 mL, hacerlo por triplicado y también un blanco.
2. Adicionar exactamente 20 mL de Ba(OH)₂ · 8H₂O 0.2 N.
3. Favorecer las condiciones anaerobias utilizando atmósfera de nitrógeno.
4. Tapar el matraz con una septa y dejar en agitación durante 24 h a temperatura ambiente.
5. Retirar el matraz, filtrar la suspensión y lavar el residuo con agua destilada libre de CO₂.
6. Realizar la titulación potenciométrica del filtrado con una solución de HCl 0.5 N hasta pH de 8.4.

La acidez total fue calculada tomando en cuenta la correlación del volumen de ácido en función de la cantidad consumida por el blanco. Para este cálculo se utilizó la siguiente ecuación:

$$AT = \frac{(V_b - V_m) \times N \times 1000}{\text{mg (muestra)}} \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 7)$$

Donde: V_b y V_m representan el volumen gastando de HCl en el blanco y en la muestra; y N es la normalidad del ácido.

Para la determinación de grupos carboxílicos se utilizó el método de Ca(CH₃COO)₂ basándose en el intercambio de protones (H⁺) del AH y formando ácido acético, el cual se tituló potenciométricamente como a continuación se describe:

Procedimiento:

1. Pesar 50 mg de AH seco y colocarlo en un matraz erlenmeyer de 125 mL, hacerlo por triplicado y también un blanco.
2. Adicionar exactamente 10 mL de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 N.
3. Adicionar 40 mL de H_2O destilada libre de CO_2 .
4. Tapar el matraz con una septa y dejar en agitación durante 24 h a temperatura ambiente.
5. Retirar el matraz, filtrar y lavar el residuo con agua destilada libre de CO_2 .
6. Realizar la titulación potenciométrica del filtrado con una solución de NaOH 0.1 N hasta pH de 9.8.

La cantidad de grupos carboxílicos se cálculo utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{meq g}^{-1} \text{ COOH} = \frac{(\text{Vm} - \text{Vb}) \times \text{N} \times 1000}{\text{mg (muestra)}} \quad \text{-----} \quad (\text{ec } 8)$$

Donde: Vm y Vb representan el volumen gastando de NaOH en la muestra y en el blanco; y N es la normalidad de la base.

La cantidad de grupos hidroxilos fenólicos fue calculada por diferencia entre la acidez total y la acidez de los grupos carboxílicos [71].

4.2.6 Espectroscopia de IRTF

Está técnica se basa en la determinación de bandas de absorción características en la región del infrarrojo, lo que está relacionado con las vibraciones moleculares de los grupos funcionales de los AHs, sin alterar su composición química. Al aplicar esta técnica es importante señalar que las bandas de absorción son monótonas, sin muchos máximos y mínimos muy pronunciadas, lo cual se atribuye a su alto peso molecular y a la heterogeneidad de la molécula [72].

En la actualidad, el método de espectroscopia de infrarrojo se emplea en la investigación de la estructura química de los AHs, identificando en los correspondientes espectros sus posibles y más abundantes grupos funcionales, basando en ellos la hipótesis de los compuestos que pueden encontrarse en las diferentes fracciones y así poder compararlos. Los espectros de IRTF fueron obtenidos en un espectrofotómetro Perkin Elmer modelo Spectrum GX, preparando pastillas con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr y utilizando el intervalo de número de onda comprendido de 4000 a 400 cm^{-1} .

4.2.7 Calorimetría diferencial de barrido y Análisis termogravimétrico

Las técnicas termo-analíticas como ATG y CDB ambas técnicas permiten obtener parámetros químicos y físicos (entalpías, porcentaje de pérdida en peso por la eliminación de agua química y moléculas pequeñas) de los AHs en función de la temperatura [60, 73], determinando la temperatura máxima o temperatura de transición de los AHs antes de su degradación total, es decir, evaluando la estabilidad térmica de estos ácidos.

Para obtener los correspondientes termogramas por ATG se utilizaron \approx 2.0 mg de muestra que se colocaron en cápsulas o crisoles de aluminio (10 mm de diámetro y 5 mm de altura), se sellaron herméticamente para evitar pérdidas de peso. Posteriormente, se llevaron a un equipo Mettler Toledo modelo TGA/SDTA 851^e para el análisis en un intervalo de 25 a 500 °C con una tasa de calentamiento de 10 °C / min. Como gas de arrastre se utilizó nitrógeno con un flujo de 20 mL / min y la calibración se realizó con un estándar de Indio.

Otra técnica termo-analítica que se utilizó fue CDB en donde se registro de forma continua la capacidad calorífica aparente de los AHs en función de la temperatura, obteniéndose lo que comúnmente se denomina un termograma. Éste generalmente está caracterizado por una señal de absorción de calor correspondiente a un proceso o transición térmicamente inducida que corresponde a un proceso endotérmico. En CDB se utilizaron básicamente dos celdas, una

actúa de referencia y la otra que contiene la muestra, ambas situadas simétricamente dentro de un caparazón metálico diseñado para crear un entorno casi adiabático. La temperatura de este caparazón se controla a través de termosensores y efectores apropiados para que esté en todo momento muy próxima a la temperatura de las celdas. Las muestras se colocaron en cápsulas de aluminio (10 mm de diámetro y 5 mm de altura) que se sellaron herméticamente, posteriormente, se midieron en un equipo Mettler Toledo modelo DSC822^e en un intervalo de 25 a 500 °C a una razón de calentamiento de 10 °C. En ambas técnicas se utilizó la misma cantidad de muestra y las condiciones de operación de los dos equipos fueron las mismas [74].

Todos los resultados obtenidos en la caracterización de los AHs nos permitieron observar su evolución a lo largo de este trabajo.

4.3 EFECTO DE LA ACIDEZ EN LA MACROMOLÉCULA DEL AH MEDIANTE TITULACIONES ESPECTRO-POTENCIOMÉTRICAS

Se realizaron titulaciones ácido-base de una solución de AH-L de 10 ppm. La primera titulación se hizo partiendo de la solución básica del AH (pH ≈10.56) y adicionando 0.2 mL de HCl 4×10^{-3} N como valorante. La titulación se continuó hasta pH ≈ 3 (antes de la precipitación del ácido húmico) obteniendo los espectros por UV/Vis de 700 a 200 nm a cada adición y registrando las absorbancias de interés a diferentes longitudes de onda (280, 465 y 665 nm). La misma solución se valoró posteriormente con NaOH 4×10^{-3} N hasta regresar al pH inicial (pH ≈10.56) y nuevamente registrando las absorbancias de utilidad. El procedimiento descrito anteriormente se llevó a cabo de forma consecutiva tres veces más utilizando la misma solución de AH.

Posteriormente, se realizaron otro tipos de experimentos utilizando las mismas concentraciones tanto del AH-L como de los valorantes (HCl y NaOH) y llevando a

cabo el mismo procedimiento de la valoración anterior, pero ahora a diferentes valores de pH, es decir, en el primer experimento se inició con la solución básica del AH adicionando HCl hasta un pH ≈ 6 (valorando solamente los grupos fenólicos), posteriormente, se regresó al pH inicial (pH ≈ 10.56) con NaOH. El segundo experimento consistió en partir de la solución del AH acidificada teniendo un pH inicial ≈ 6 y añadiendo HCl hasta un pH ≈ 3 (valorando solamente los grupos carboxílicos) y nuevamente regresando al pH inicial. Cada uno de los experimentos anteriores se realizó de forma continua tres veces más, utilizando en cada uno de los casos la misma solución de AH. A partir de las absorbancias obtenidas de cada uno de los espectros a una longitud de onda de 280 nm se determinó el coeficiente de absorptividad molar (ϵ_{280}) utilizando la ec 4 de Lambert-Beer, el porcentaje de aromaticidad y el peso molecular promedio del AH se calcularon utilizando las ecuaciones 5 y 6.

4.4 EFECTO DE LOS PROCESOS DE SOLUBILIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN EN LA ESTABILIDAD DEL AH POR MEDIO DE RE-EXTRACCIONES CONTINUAS

Se realizaron pruebas de re-extracción (solubilización y precipitación) del AH comercial Lignina (AH-L), con el fin de observar si durante este proceso existen cambios químicos que alteren o modifiquen significativamente la interpretación de resultados posteriores. Es importante mencionar en este apartado que la hidrólisis alcalina es un método basado en la degradación de compuestos simples (aminoácidos, fenoles y compuestos de N) que son identificados y relacionados con la macromolécula inicial del AH. Por lo consiguiente, para evaluar la estabilidad que presenta el AH-L primero se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se realizaron re-extracciones continuas partiendo del AH original (**AH-I**) para preparar una solución de 1000 ppm [41] con un pH ≈ 12.63 por la adición de NaOH, posteriormente, se añadió HCl concentrado hasta obtener un pH ≈ 1 para

re-precipitar el AH. El precipitado se filtró a vacío y se secó en la estufa a 80 °C durante 2 h (**AH-II**). De la fracción AH-II se preparó nuevamente una solución de 1000 ppm regulando el pH a 12.63 por medio de la adición de NaOH; el AH se precipitó mediante el tratamiento anterior obteniéndose una nueva fracción (**AH-III**). A partir de la fracción AH-III y siguiendo el mismo procedimiento descrito anteriormente se obtuvo la fracción **AH-IV** y finalmente la fracción **AH-V**. Con la finalidad de observar que tanto afecta este proceso a la estructura del AH, cada una de las fracciones obtenidas se analizaron y caracterizaron por diferentes técnicas y métodos analíticos descritos en el apartado 4.2: análisis elemental, espectroscopias: IR y UV/Vis, análisis térmico: CDB y ATG; y la determinación de acidez total y grupos funcionales carboxílicos e hidróxilos fenólicos. Este procedimiento se realizó por duplicado, obteniendo dos lotes (lote I y lote II) cada uno con cinco fracciones diferentes.

En este apartado es importante mencionar que el procedimiento descrito anteriormente se llevo a cabo primero para cuatro fracciones, discutiendo en los resultados el porqué se decide re-extraer una fracción más para obtener un total de cinco fracciones diferentes en cada lote.

4.4.1 Cinéticas en solución acusa de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V por UV/Vis

Las fracciones obtenidas a partir del proceso de re-extracción (del lote I) se analizaron por espectroscopia de UV/Vis en diferentes tiempos: desde el primer día de la preparación de las diluciones (10 ppm) a partir de su correspondiente solución madre (1000 ppm) [41]; y posteriormente cada mes, esto con la finalidad de observar su cinética en solución y calcular los diferentes parámetros como: coeficiente absortividad molar (ϵ_{280}), porcentaje de aromaticidad, peso molecular promedio y el cociente: E_4/E_6 , los cuales se calcularon con las ecuaciones mencionadas anteriormente (ecuaciones: 4, 5 y 6) y nos ayudaran a obtener una mayor información acerca de las posibles modificaciones de la molécula de AH.

4.4.2 Termo-análisis en sólido de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V por CDB e IR

Se analizaron cualitativamente las bandas de los grupos funcionales principales de los espectros obtenidos por espectroscopia de IRTF de cada una de las fracciones (del lote I), después de haber sido tratadas térmicamente por CDB, es decir, primero se sometieron a cierta temperatura controlada, en donde, la temperatura inicial ($T_{inicial}$) fue de 25 °C para los tres casos variando en cada uno de ellos la temperatura final (T_{final}) que fueron: 150, 300 y 500 °C. Este tipo de estudio fue utilizado para desarrollar un método de análisis termo-analítico (CDB) y complementarlo con un método espectroscópico (IR), los cuales, permitan determinar los diferentes grados de humificación, estabilidad termo-oxidativa y labilidad en la estructura de cada una de las fracciones del AH-L antes de su degradación total (mineralización), con el fin de desarrollar y verificar modelos estructurales que puedan emplearse más a fondo para predecir interacciones moleculares con los contaminantes en el medio ambiente.

4.5 ESTIMACIÓN DE LAS CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE COMPLEJACIÓN DE LOS AHs Y LAS FRACCIONES: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV Y AH-V CON Cu (II) Y Pb (II)

Para la estimación de las constantes de equilibrio se utilizaron los AHs comerciales: AH-Le y AH-L, y el AH extraído en el laboratorio de una muestra de suelo mediante el proceso de extracción de pirofosfato de sodio e hidróxido de sodio (11.15 g de $Na_2P_2O_7 \cdot 10H_2O$ y 1 g de NaOH en 250 mL de solución) [1], y las fracciones re-extraídas como se indicó en el apartado 4.4. Cada uno de los AHs (incluyendo cada una de las fracciones) caracterizados y analizados adecuadamente interaccionaron con el ión metálico Cu(II) y posteriormente, se evaluó la interacción de estos ácidos cambiando el metal por el catión Pb(II). Para ello, se procedió de la siguiente forma:

Antes de realizar las interacciones: AH-Cu²⁺ y AH-Pb²⁺, primero se activó y calculó la capacidad de intercambio catiónico de una resina de tipo Dowex 50W-X8, 20-50

tamaño de partícula (Na^+), pesando 5 g de resina, adicionando 500 mL de HCl 1.0 M, seguido por un lavado con 500 mL de HCl 0.1 M y finalmente con agua desionizada hasta obtener un pH neutro. Posteriormente, la resina se cargó con NaOH 0.1 N en NaCl al 5 % (100 mL), lavando también con agua desionizada como último paso. Una vez que la resina está en forma sódica se secó en la estufa durante una hora a 40 °C [75].

Se realizaron algunos experimentos previos para establecer correctamente ciertos parámetros como: cantidad de reactivos, concentraciones y tiempo, entre otros, antes de llevar a cabo el método de complejación. Este método consistió de preparar soluciones con diferentes concentraciones de AH (0, 3.0×10^{-6} , 6.0×10^{-6} , 9.0×10^{-6} , 3.0×10^{-5} y 4.0×10^{-5} M) con una concentración constante del metal (3.1×10^{-5} M para Cu^{2+} y 9.7×10^{-6} M para Pb^{2+}), ajustando cada una a pH = 3.5 con HCl ó NaOH 0.1 y 1 N (pH donde se asegura al metal libre) [76]. Las diferentes soluciones se mezclan con 0.5 g de resina y se ponen en agitación durante 1 h, transcurrido este tiempo se filtra la solución y el metal no intercambiado en la resina se determina en un espectrofotómetro de Absorción Atómica Modelo SpectrAA 880, Marca Varian. Finalmente, con los resultados obtenidos y realizando los cálculos correspondientes se obtienen las constantes de equilibrio respectivas tomando en cuenta las siguientes consideraciones [77]:

Si M_L es el metal libre en solución (Cu^{2+} o Pb^{2+}) en un sistema que contiene un ligando orgánico que es L (AH), x es el número de moles de ligando que se combinan con un mol de metal y ML_x es el complejo ligando orgánico-metal en solución (AH-Metal), la reacción de complejación puede expresarse de la siguiente manera:



Por otro lado, M_R es el metal libre en solución, R es la resina de intercambio catiónico y MR el metal enlazado con la resina por unidad de peso (mol/kg). El

proceso de extracción de M a la resina se puede representar con el siguiente equilibrio:



La constante de estabilidad para el complejo (K), se determina, tomando como base la ecuación 9 con la siguiente ley de acción de masas:

$$K = \frac{[MLx]}{[M_L] [L]^x} \quad \text{ec 11}$$

La constante de distribución del metal en solución (λ_0), en el proceso de intercambio catiónico en ausencia de un agente complejante orgánico (AH), puede expresarse de la siguiente forma:

$$\lambda_0 = \frac{MR}{M_R} \quad \text{ec 12}$$

$$[M_R] = [M_L]$$

$$[M_L]_{\text{Total}} = [M_L] + [MLx] \quad \text{ec 13}$$

Si se sustituye la ec 13 en la ec 12 se obtiene la constante de distribución en presencia de un agente complejante (λ) que se representa de la siguiente forma:

$$\lambda = \frac{MR}{(M_L + MLx)} \quad \text{ec 14}$$

Relacionando las ecuaciones 12 y 13 se obtiene la siguiente ecuación:

$$\frac{\lambda_0}{\lambda} = \frac{M_L + MLx}{M_R} \quad \text{ec 15}$$

Siendo M_L y M_R iguales en este sistema descrito, la constante de estabilidad (K) del complejo ML se obtiene finalmente:

$$\log \left(\lambda_0 / \lambda - 1 \right) = \log K + x \log [L] \quad \text{ec 16}$$

donde:

λ_0 = Constante de distribución en ausencia de AH

λ = Constante de distribución en presencia de AH

$\log K$ = logaritmo de la constante de estabilidad

x = número de moles de AH que se combinan con un mol de metal

$[L]$ = concentración del AH en Molaridad (mol/litro)

Los valores: de “ x ” y “ $\log K$ ” fueron determinados al realizar el análisis por regresión lineal de los correspondientes datos de la curva en el plano en forma logarítmica: $\log (\lambda_0/\lambda-1)$, obteniendo la pendiente y el intercepto de la línea descrita por la ec 16, que corresponde al valor logarítmico de la constante de estabilidad ($\log K$).

Es importante aclarar que λ_0 fue determinada por la siguiente ecuación:

$$\lambda_0 = \frac{\alpha_0 V}{(100 - \alpha_0) g} \quad \text{ec 17}$$

donde:

α_0 = % de metal enlazado a la resina

$(100 - \alpha_0)$ = % de metal en solución

V = Volumen de solución

g = gramos de resina

El procedimiento descrito y los cálculos mencionados se realizaron para cada uno de los AHs y sus fracciones.

Capítulo 5. Resultados y discusión

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En este capítulo se presentan los resultados correspondientes a cada método o técnica descritos en el capítulo anterior. Antes de iniciar con los resultados de caracterización es importante mencionar que el rendimiento obtenido del AH-S en el método de extracción utilizando: $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e NaOH como agentes extractantes fue de 0.47%.

5.1 CARACTERIZACIÓN Y COMPARACIÓN DE LOS AHS (COMERCIALES Y EXTRAÍDO EN EL LABORATORIO) POR TÉCNICAS ANALÍTICAS

5.1.1 Análisis elemental

Se realizó la caracterización de los AHS por diferentes técnicas de análisis (porcentaje de CO, CI, CT [64, 65, 78], cenizas y AE; UV/Vis, IRTF, titulaciones ácido-base, ATG y CDB). En lo que corresponde a los resultados por análisis elemental, éstos suelen expresarse por medio de las relaciones entre átomos (Tabla 4).

Tabla 4. Composición elemental de los AHS en estudio y las relaciones: H/C y O/C con base en la relación de sus átomos. *%O calculado como la diferencia del 100%. (entre paréntesis %DSR para un total de 3 análisis).

Muestra	Composición Elemental				Relación:		
	%C	%H	%N	%O*	C:H:N:O (átomos)	H/C	O/C
<i>AH-Le</i>	40.06 (3.41)	3.21 (5.97)	0.91 (2.20)	55.82 (2.80)	51:49:1:54	0.96	1.06
<i>AH-L</i>	32.83 (3.50)	2.83 (1.78)	0.98 (5.10)	63.36 (1.97)	39:40:1:57	1.03	1.46
<i>AH-S</i>	47.38 (0.96)	4.18 (0.14)	2.98 (2.38)	45.46 (1.16)	19:20:1:13	1.05	0.68

Los bajos porcentajes de nitrógeno (menores del 6%) encontrados en el AH-Le y AH-L pueden indicar que en dichas moléculas el N se encuentra situado en los enlaces que unen los núcleos aromáticos o bien en cadenas alifáticas, lo que implica moléculas poco resistentes a la hidrólisis ácida efectuada durante el proceso de extracción de dichos ácidos (mayor pérdida de N). Por el contrario, el porcentaje de N en el AH-S se ubica en valores mayores en comparación con los AHs anteriores, por lo que se considera que el nitrógeno en el AH-S forma parte de compuestos cíclicos, más resistentes a la hidrólisis ácida [1]. Asimismo, el alto porcentaje de N en este ácido (AH-S) puede deberse a que proviene de un suelo con una gran cantidad de materia orgánica debido a la presencia y a la constante degradación de vegetales.

De acuerdo a la Tabla 4 es posible observar por la magnitud de la relación H/C que todos son de naturaleza aromática en diferentes grados respecto a los resultados obtenidos, decreciendo en el siguiente orden: AH-Le > AH-L > AH-S, ya que de acuerdo a la literatura, esta relación es inversamente proporcional a la aromaticidad, es decir, valores ≤ 1 indican un predominante carácter aromático [1, 2]. .

Por otro lado, si bien se espera que la relación O/C para los AHs provenientes del suelo sea cercana a 0.5, se admite que valores mayores corresponden a AHs con un alto contenido de grupos carboxílicos y/o carbohidratos. Así, en lo que respecta a los AHs en estudio, el AH-L presenta una mayor cantidad de grupos carboxílicos y/o carbohidratos en comparación con el AH-Le y el AH-S. Es importante mencionar que la relación H/C y O/C van relacionados con su origen que se ve afectado por diversos factores (clima, biomasa vegetal y animal, grado de humificación, entre otros) y por el método de extracción [41, 46, 79].

5.1.2 Porcentaje de carbono: orgánico, inorgánico y total, y contenido de cenizas

Adicionalmente a la determinación de carbono por análisis elemental se utilizaron técnicas por vía húmeda para las determinaciones de los porcentajes de CO, CI y CT descritas anteriormente, obteniendo los resultados que se muestran en la Tabla 5. Es posible observar que el CT para los AHs difiere por ambas técnicas (por análisis elemental y por vía húmeda), pero realizando el análisis estadístico correspondiente (comparación de dos medias experimentales) no hay diferencia significativa en los resultados y la relación que marcan por ambas técnicas es la misma, decreciendo en el siguiente orden: AH-S > AH-Le > AH-L. Por otro lado, el alto porcentaje en cenizas en los AHs (del cual no es posible liberarse ni volviendo a precipitar) señalan la existencia de firmes uniones (posiblemente complejas) con metales que sustituyen al hidrógeno (Tabla 5).

Tabla 5. Caracterización de los AHs en estudio (composición de CO, CI, CT, cenizas, propiedades espectroscópicas, acidez total y cantidad de grupos funcionales: -COOH y -OH).

	ÁCIDOS HÚMICOS		
	AH-Le	AH-L	AH-S
%CO	37 (4.68)	32 (5.41)	41 (4.23)
%CI	4.96 (5.59)	3.44 (4.03)	4.63 (6.23)
%CT	41.96 (4.79)	35.44 (4.50)	45.63 (4.43)
%Cenizas	9.98 (1.00)	12.23 (0.33)	6.09 (1.34)
$\epsilon_{(280)}/(L \text{ (mol de CO)}^{-1} \text{ cm}^{-1})$	1,547.55 (1.31)	1,383.58 (0.77)	1,158.01 (0.56)
% Aromaticidad	84.12 (1.21)	75.92 (0.71)	64.64 (0.50)
P.M.	6,664.75 (1.22)	6,010.47 (0.71)	5,110.44 (0.51)
E_4/E_6	2.33 (0.91)	2.10 (0.00)	4.26 (0.50)
Acidez total (meq g ⁻¹)	6.12 (2.12)	3.86 (3.74)	10.55 (3.28)
COOH (meq g ⁻¹)	1.98 (5.55)	2.21 (3.84)	4.58 (3.22)
OH (meq g ⁻¹)	4.14 (5.78)	1.64 (5.18)	5.97 (6.24)

* % DER entre paréntesis para un total de tres análisis

5.1.3 Espectroscopia UV/Vis

Antes de iniciar con la caracterización de los AHs por espectroscopia UV/Vis, primero se evaluaron diferentes diluciones a partir de la solución madre del AH (1000 ppm), con el fin de elegir la concentración adecuada, como se muestra en la Figura 9.

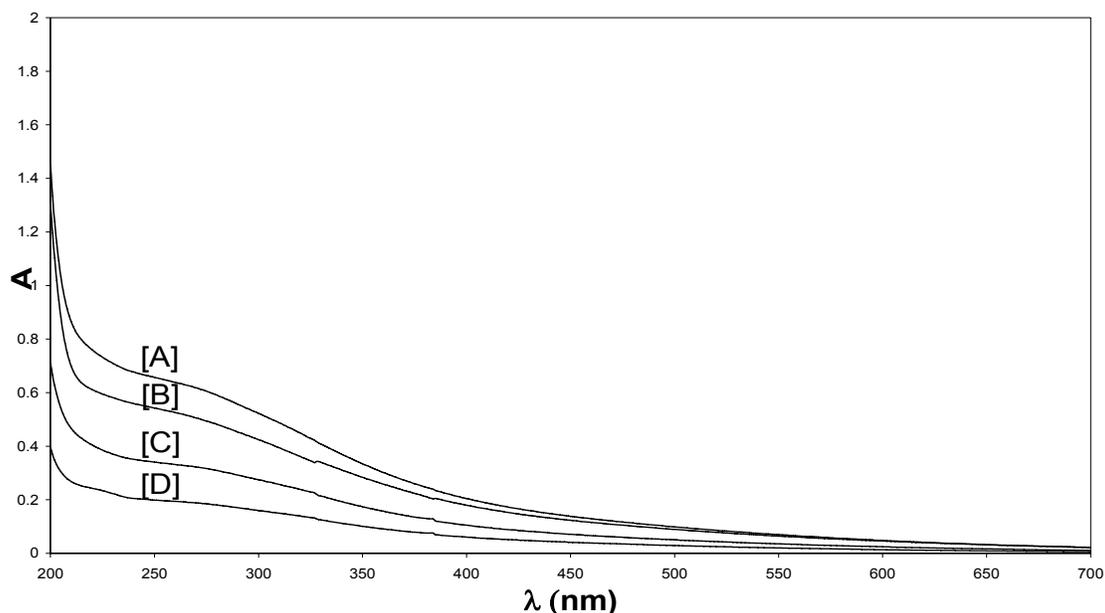


Figura 9. Espectros de UV/Vis del AH-Le utilizando diferentes factores de dilución:
[A] 50, [B] 67, [C] 100, [D] 200.

Como parte de la caracterización de los AHs, una vez elegido el factor de dilución: F.d. de 1 en 100 (Figura 9-[C]) para obtener un máximo de absorbancia < 1, se obtuvieron sus correspondientes espectros por UV/Vis desde 700 a 200 nm (Figura 10) registrando las absorbancias a las diferentes longitudes de onda de interés (280, 465 y 665 nm). Con los datos del espectro se calculó el coeficiente de absorptividad molar a 280 nm con base en la concentración de CO (ec 4), ya que a esta longitud de onda ocurren las transiciones electrónicas $\pi - \pi^*$ de las sustancias fenólicas, derivados de anilina, ácidos benzoicos, polifenoles e hidrocarburos policíclicos aromáticos [61, 66]. Posteriormente, utilizando el

coeficiente de absorptividad molar del correspondiente AH, se calculó el porcentaje de aromaticidad y el peso molecular promedio (ecuaciones 5 y 6). Los resultados obtenidos de las propiedades espectroscópicas de los AHs se exponen en la Tabla 5.

A pesar que los espectros de los AHs caracterizados presentan la misma tendencia, existen pequeñas diferencias (Figura 10), generando diferentes valores en su respectivo cociente E_4/E_6 (Tabla 5). Sin embargo, y de acuerdo a lo reportado en la literatura [72], los AHs que se analizaron en este trabajo presentan un valor del cociente $E_4/E_6 < 5$, lo cual puede indicar que son ácidos maduros (mayor carácter aromático y peso molecular), decreciendo en el siguiente orden: AH-Le > AH-L > AH-S. Esto último coincide con el porcentaje de aromaticidad y el peso molecular promedio obtenidos mediante el coeficiente de absorptividad molar.

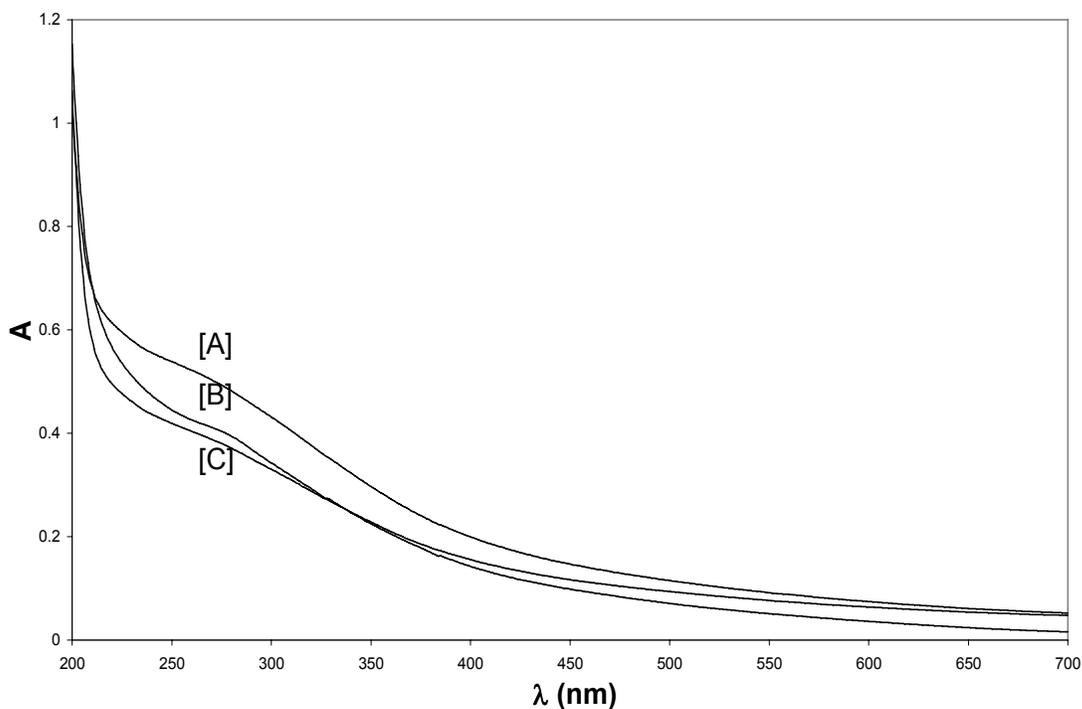


Figura 10. Espectros de absorción UV/Vis: [A] AH-Le, [B] AH-S y [C] AH-L, 10 mg/L, pH =11.09, longitud de celda: 1 cm.

Es importante resaltar que los parámetros espectroscópicos descritos y calculados en este apartado permitirán la comparación subsecuente en los estudios de estabilidad de la molécula del AH con respecto al tiempo en solución acuosa (cinéticas en solución acuosa del AH).

5.1.4 Acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos

Para los AHs son característicos los grupos funcionales carboxílicos (-COOH) e hidroxilos fenólicos (-OH), cuyo hidrógeno es susceptible a las reacciones de sustitución [62-63]. Por la presencia de estos grupos se determinan las propiedades ácidas y la capacidad de intercambio catiónico. La acidez total de los AHs (grupos: -COOH y -OH), se determinó por el método de Ba(OH)₂ y para la determinación de grupos -COOH se utilizó el método de Ca(CH₃COO)₂, como se mencionó en la experimentación. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 5.

Del análisis de las Tablas 4 y 5 es posible observar una relación en lo que respecta al porcentaje de H y la acidez total de los AHs. Así, se puede inferir que el AH-Le y AH-S presentan un mayor porcentaje de hidrógeno, es decir, tienen una mayor posibilidad de poseer grupos funcionales (-COOH y -OH) con protón intercambiable [66], lo que implica una acidez total mayor (ver Tabla 5). Por otro lado, y de acuerdo a la relación O/C es el AH-L el que posee mayor cantidad de grupos carboxílicos y carbohidratos con respecto al AH-Le, lo que se confirmó por el análisis con Ba(OH)₂. Sin embargo, el hecho de presentar en su acidez total un resultado menor en comparación con el AH-Le y AH-S puede ser consecuencia de que una parte del oxígeno esté formando complejos con metales, hecho que se refleja en su alto contenido de cenizas (Tabla 5).

5.1.5 Espectroscopia de IRTF

Los espectros de IRTF de los AHs (AH-Le, AH-L y AH-S) (Figuras 11) revelan la presencia de bandas de absorción muy similares, independientemente de su fuente u origen natural, aunque con pequeñas diferencias de intensidad y

desplazamientos. Esto permite proponer la presencia de los mismos grupos funcionales principales y más abundantes del tipo -OH, -COOH, -C=O, de alcoholes, fenoles, ésteres, cetona o amidas [72], aunque en diferente proporción.

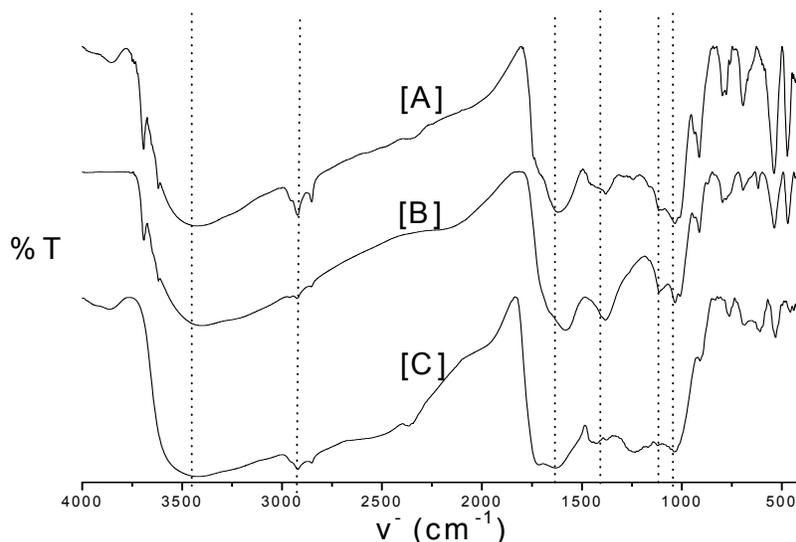


Figura 11. Espectro de IRTF: [A] AH-Le, [B] AH-L y [C] AH-S analizados en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr.

En el espectro de IRTF de los AHs como se observa en la Figura 11, la presencia de bandas de absorción que caracterizan las vibraciones de alargamiento y de flexión dentro y fuera del plano, así como las huellas dactilares (912 a 450 cm^{-1}) en las diferentes agrupaciones atómicas (Tabla 6).

En los espectros de IR de los AHs se observa la presencia de bandas de absorción que caracterizan las vibraciones de alargamiento en las siguientes agrupaciones atómicas: de **3650 a 3100 cm^{-1}** las vibraciones de O-H de alcoholes, fenoles y ácidos carboxílicos, N-H de aminas o amidas; de **3100 a 2840 cm^{-1}** las vibraciones de alargamiento de C-H de alcanos, cicloalcanos y alquenos; de **1710-1585 cm^{-1}** las vibraciones de C=O que se encuentran en los ácidos carboxílicos, cetonas, ésteres, quinonas y amidas de los compuestos alifáticos y aromáticos; a

esta misma región encontramos vibraciones de los dobles enlaces conjugados C=C, que confirman la presencia de compuestos aromáticos.

Tabla 6. Asignación de las bandas de absorción de los espectros de infrarrojo de la Figura 12.

ν cm ⁻¹	Asignación
3650-3100	ν O-H, N-H
3100-2840	ν C-H
1710-1585	ν C=O, C=C
1440-1330] O-H, =C-H ν C-N
1320-1100	ν C-O] C=O
1200-1020	ν C-C
912-450	huellas dactilares

Las bandas de flexión dentro del plano de **1440-1330 cm⁻¹** caracterizan la presencia de =C-H de alquenos, de O-H de alcoholes, ácidos carboxílicos y ésteres; en esta misma región se presentan vibraciones de alargamiento de C-N de amidas. Las bandas cerca de **1320-1100 cm⁻¹** responden a las vibraciones de alargamiento C-O de ésteres, ácidos carboxílicos y compuestos aromáticos simples y bandas de flexión dentro del plano de grupos C=O de cetonas. Finalmente, de **1200 a 1020 cm⁻¹** responden a las vibraciones de alargamiento de los grupos C-C de alcanos en general.

Las señales que se encuentran de **912 a 450 cm⁻¹** corresponden a las llamadas huellas dactilares, que son únicas para cada sustancia y que además son difíciles de asignar. Una vez caracterizadas y mencionadas las señales principales en un espectro de AH, es importante señalar las diferencias representativas de los AHs en estudio: El AH-Le (Figura 11-A) presenta mayor cantidad de cadenas alifáticas

(2943-2850 cm^{-1} C-H alcanos y CH_3), esto se relaciona con la señal característica de los polisacáridos que también presenta una banda ancha (1093-1084 cm^{-1} de C-O), por otro lado, el AH-L (Figura 11-B) presenta una disminución en la señal de las cadenas alifática, esto se relaciona con un menor valor en su peso molecular y presenta al igual que el AH-Le la banda característica de los polisacáridos. Los resultados por IR de los dos AHs coinciden con los valores presentados del análisis elemental con respecto a la relación O/C. Por otro lado, AH-S (Figura 11-C), se observa la disminución de la señal de las cadenas alifática, sin embargo, en este espectro es importante mencionar el aumento de la banda característica de los grupos funcionales $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$ (3650-3100 cm^{-1}) y comprobando el aumento de grupos $-\text{COOH}$ aparece un ensanchamiento de la banda característica del grupo carbonilo $-\text{C}=\text{O}$ (1710-1730 cm^{-1}), nuevamente confirmando la acidez del AH-S [80].

5.1.6 Calorimetría diferencial de barrido (CDB) y análisis termogravimétrico (ATG)

El análisis térmico comprende un grupo de técnicas dentro de estas se encuentra el ATG y CDB, en las cuales una propiedad física de una muestra (AH) es medida como una función de la temperatura de transición o de reacción, mientras la muestra es sujeta a un programa de temperatura controlada [73-74], logrando los termogramas de cada AH por ambas técnicas (Figuras 13 y 14).

En este apartado es importante señalar que el primer termograma obtenido del AH-S por CDB se observaron dos señales características, la primera señal máxima como endotérmica a una temperatura de 152.65 °C con un calor de reacción de $\Delta H^\circ = - 0.08654 \text{ KJ g}^{-1}$; la temperatura de la señal se ubica en el intervalo de 110-210°C, dónde según datos reportados en la literatura se trata de la evaporación constante de agua y de pequeñas moléculas orgánicas [73]. Por otro lado, en el mismo termograma se observa una segunda señal mal definida a 337.86 °C con un calor de reacción de $\Delta H^\circ = - 0.09425 \text{ KJ g}^{-1}$ que de acuerdo a la degradación térmica indica una señal exotérmica que se ubica en el intervalo de

temperatura de 240-380 °C. Esta última señal puede ser atribuida a la destrucción de grupos alifáticos, carbohidratos, compuestos con oxígeno (alcoholes o fenoles) o monómeros de lignina (Figura 12 [A]).

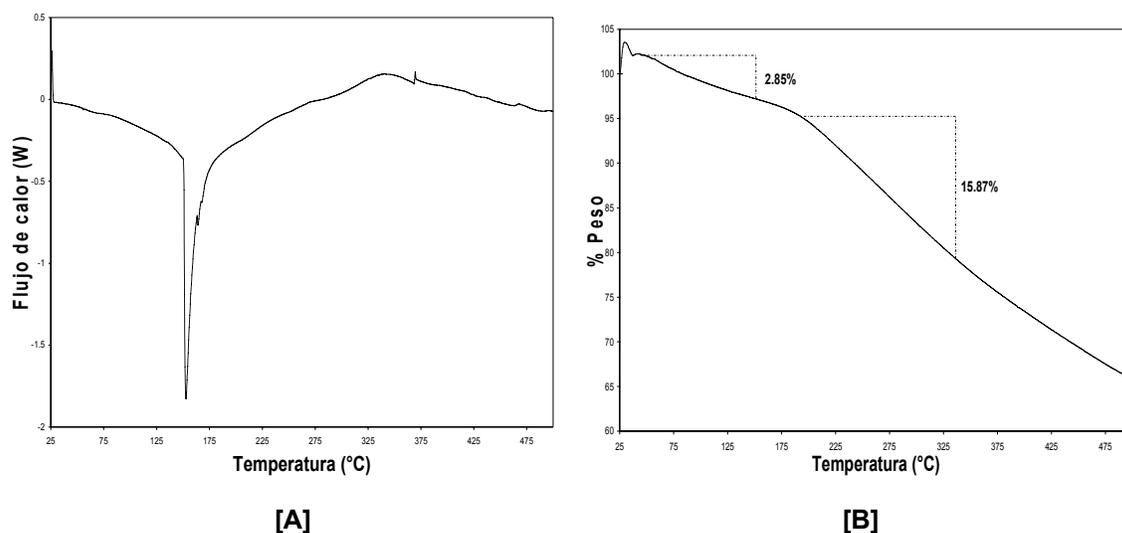


Figura 12. Termogramas de AH-S: [A] CDB y [B] ATG. Utilizando para ambos casos 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C / min, gas de arrastre: N₂ con un flujo de 20 mL / min y calibración con Indio.

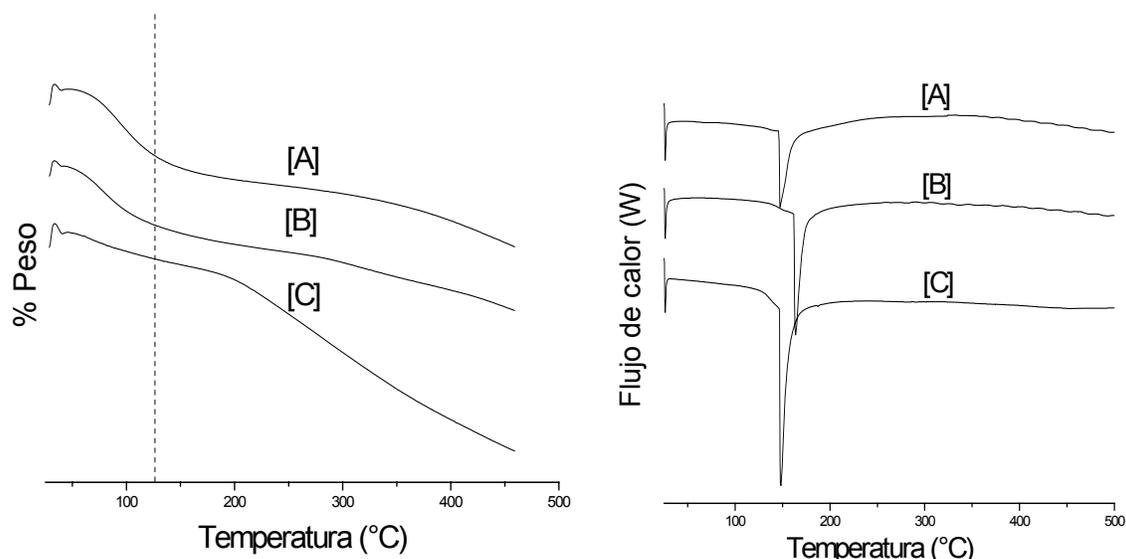
Comparando los termogramas de la Figura 12 por CDB y ATG para el AH-S se obtuvieron las temperaturas de transición, para la primera señal la temperatura es 152.65 °C con una pérdida en peso de 2.85%, mientras que para la segunda señal es de 337.86 °C con un porcentaje de 15.87% de pérdida en peso. Con los resultados obtenidos y presentados en la Tabla 7, podemos concluir que el AH-S presenta poca agua química en su macromolécula y por otro lado, confirmamos que es muy aromático y estable (no presenta pérdida de pequeñas moléculas lábiles) por el bajo valor de pérdida en peso obtenido y comparado con resultados reportados en la literatura [73]. Es importante mencionar que al reproducir el termograma del AH-S por CDB no se logró obtener la segunda señal, presentando los resultados en la Figura 13 y Tabla 8.

Tabla 7. Propiedades térmicas del AH-S

Muestra	CDB				ATG	
	Señal-I		Señal-II		Señal-I	Señal-II
	Ts (°C)	ΔH (kJ g⁻¹)	Ts (°C)	ΔH (kJ g⁻¹)	Pérdida de masa (%)	
AH-S	152.65	- 0.08654	337.86	- 0.09425	2.85	15.87

En los termogramas obtenidos por ATG de los diferentes AHs (AH-Le, AH-L y AH-S), se puede apreciar que el cambio no ocurre repentinamente, sino que tiene lugar a través de un intervalo de temperaturas, esto hace que resulte un poco complicado determinar una temperatura de transición (temperatura de la señal máxima), sin embargo, realizando los cálculos correspondientes y comparando los termogramas del ATG con los de CDB se obtuvieron las temperaturas de transición de los AHs (Figuras 13 y 14). Así, para el AH-Le la temperatura de transición esta en 148.21 °C con una pérdida en peso de 8.40%, mientras que para el AH-L su temperatura de transición es de 163.55 °C con un porcentaje de 8.57% de pérdida en peso y finalmente para el AH-S la temperatura de transición es de 147.89 °C y una pérdida en peso de 2.85% (Tabla 8).

Los porcentajes de las pérdidas de peso y las temperaturas de transición para los diferentes AHs son muy bajos en comparación con los reportados en la literatura [68-69], lo cual se verifica que la pérdida de peso en los diferentes ácidos se debe básicamente a la pérdida de moléculas de agua química. No obstante, para confirmar lo anterior, se continuó con una serie de análisis por estas técnicas termoanalíticas.



Figuras 13 y 14. Termogramas: ATG [A] AH-Le, [B] AH-L y [C] AH-S; CDB [A] AH-S, [B] AH-L y [C] AH-Le. Utilizando para ambas técnicas 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de 10 °C/min, gas de arrastre: N₂ con un flujo de 20 mL/min.

Tabla 8. Propiedades térmicas de los AHs (AH-Le, AH-L y AH-S) por CDB y ATG.

Muestra	CDB			ATG
	Ts (°C)	ΔH (kJ g ⁻¹)	Pérdida de agua (%)	Pérdida de masa (%)
AH-Le	148.21	- 0.22701	9.87	8.40
AH-L	163.55	- 0.17329	7.53	8.57
AH-S	147.89	- 0.11914	5.18	2.85

Ts: temperatura de la señal máxima en °C obtenida por CDB.

De esta forma se puede concluir que en los tres AHs el grado de aromaticidad decrece en el siguiente orden: AH-Le > AH-L > AH-S tomado en cuenta todos los resultados obtenidos por AE, UV/Vis, titulaciones ácido/base y IRTF. Por lo tanto, se piensa que las cadenas alifáticas que componen al AH-S se encuentran en la parte interna de la macromolécula, lo cual hace difícil la pérdida de este tipo de

compuestos, de esta forma el AH-S extraído en el laboratorio y comparado con AHs comerciales es el más alifático, poliácido y tiende a ser más estable.

5.2 EFECTO DE LA ACIDEZ EN LA MACROMOLÉCULA DEL AH-L MEDIANTE TITULACIONES ESPECTRO-POTENCIOMÉTRICAS

Para evaluar la estabilidad que presenta el AH-L en solución acuosa a diferente pH, se realizaron titulaciones ácido-base (Figura 15) seguidas mediante espectroscopia UV/Vis, registrando las absorbancias a diferentes longitudes de onda (280, 465 y 665 nm). Con los valores de absorbancia se calcularon los diferentes parámetros espectroscópicos descritos y utilizados anteriormente, como es: $\epsilon_{(280\text{ nm})}$, % aromaticidad, P.M. promedio y el grado de humificación obtenido por la relación E_4/E_6 [66], utilizando las ecuaciones que se presentaron en el apartado 4.2.4 (ecuaciones 4, 5 y 6). Los resultados se presentan en la Tabla 9.

Como ya se mencionó en la metodología, las titulaciones ácido-base que se presentan en la Figura 15 se realizaron de forma consecutiva utilizando la misma solución de AH, también es importante mencionar que este tipo de experimento se realizó por triplicado para analizar la reproducibilidad y poder llegar a una conclusión acertada.

La secuencia de las titulaciones como ya se explicó en el apartado 4.3 se llevó a cabo debido a experimentos previos que consistían en titular una muestra de AH primero con ácido (HCl) y llegar a un pH de 3, posteriormente esa misma muestra se titula con una base (NaOH) hasta llegar al pH inicial (pH de 10), observando lo mismo que en la Figura 15-A, en donde, al valorar con HCl se observan claramente los dos saltos en la curva, correspondientes a la protonación de los grupos fenólicos (pH \approx 9) y carboxílicos (pH \approx 4); sin embargo, cuando se tituló con NaOH se observó solamente un salto, cuando se esperarían nuevamente los dos de la desprotonación de los mismos grupos funcionales. Por esta razón, se

realizó una secuencia de titulaciones observando el mismo comportamiento en la primera y segunda titulación (Figura 15-A y 15-B). Lo anterior puede explicarse por las impurezas del AH (pequeños monómeros orgánicos), que se agregan por fuerzas electrostáticas intermoleculares cuando este se encuentra a pHs ácidos (pHs \approx 3-4). Según datos reportados en la literatura al estar el AH en solución a pH ácido sufre una agregación interna o por sí mismo [55], titulando posteriormente solamente el exceso de HCl con NaOH. Por esta razón, se observa solamente un salto en la curva de titulación. En las titulaciones restantes se empieza a observar la desprotonación de los grupos fenólicos y carboxílicos (Figura 15-C y 15-D) al titular con NaOH (se comprobó calculando la 1ra. y 2da. derivada para cada una de las curvas de titulación).

Al analizar todos los resultados de las titulaciones ácido-base del AH-L con HCl 4×10^{-3} N, se observó una disminución de todos los parámetros calculados (coeficiente absorptividad molar (ϵ_{280}), porcentaje de aromaticidad, peso molecular promedio y el cociente E_4/E_6), debido a la protonación de los iones carboxílicos (COO^-) y fenólicos (O^-), disminuyendo las cargas negativas y/o la deslocalización de los electrones en los compuestos aromáticos y por lo consiguiente, la absorción a la longitud de onda de $\lambda = 280$ nm. Mientras que al seguir titulado con el NaOH 4×10^{-3} N sucede lo contrario, aumentando ahora su absorción (Figura 16), debido a la desprotonación de los grupos $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$, pero sin regresar a los parámetros iniciales. Esto orilla a pensar que se están llevando a cabo destrucciones oxidativas (autooxidación), condensación de amino-carbonilos y por consecuente reacciones de polimerización reafirmando lo que ya se había mencionado en los apartados anteriores.

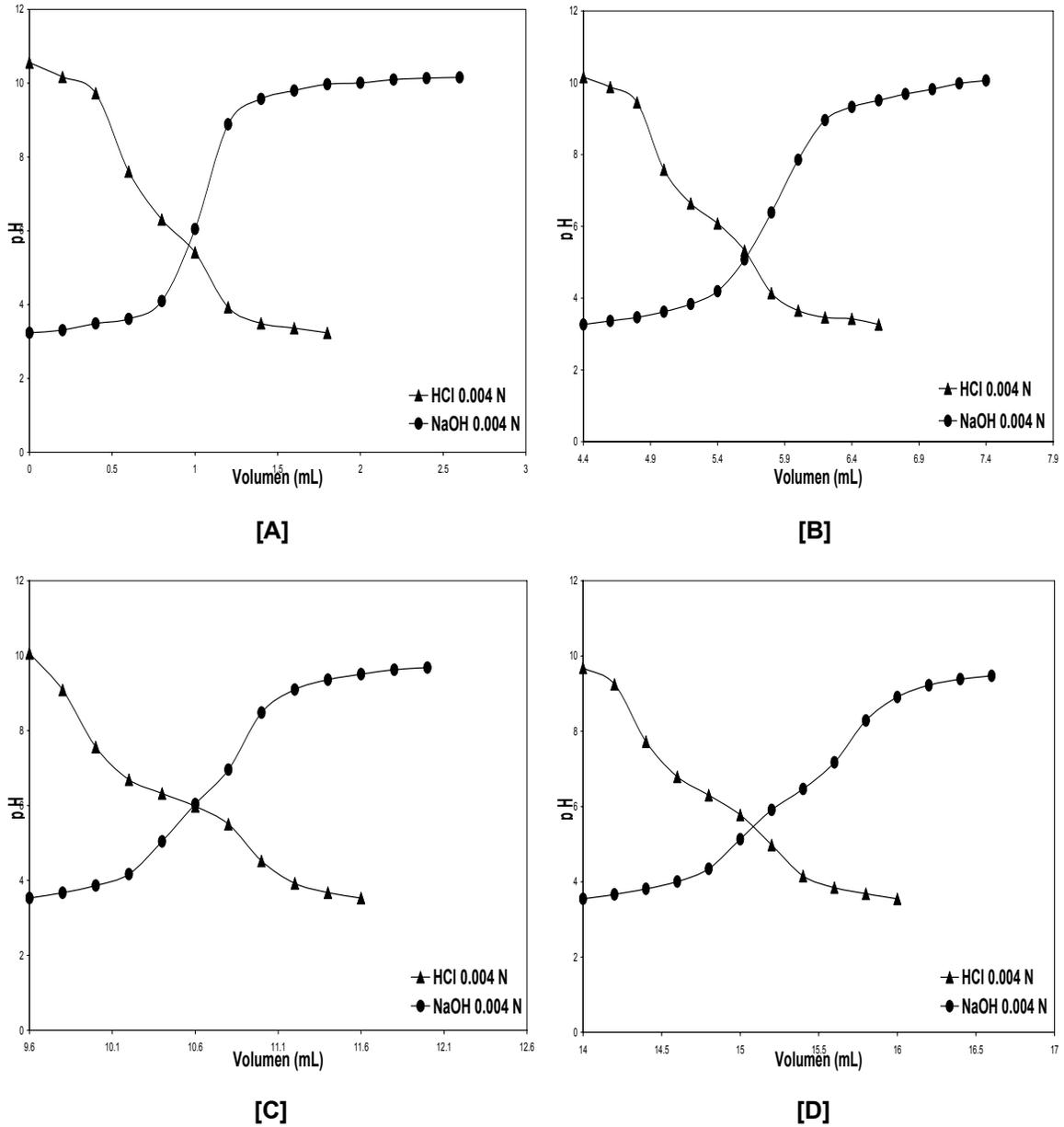


Figura 15. Titulaciones ácido-base del AH-L con una concentración inicial de 10 ppm. Titulando primero con $\text{HCl } 4 \times 10^{-3} \text{ N}$ y posteriormente, con $\text{NaOH } 4 \times 10^{-3} \text{ N}$.

Lo anterior se puede apreciar con más claridad en la Figura 16, donde se representan las absorbancias de la solución a $\lambda = 280 \text{ nm}$ según el pH en cada valoración tomando en cuenta la dilución constante (al ir agregando ácido o base) a la solución de partida.

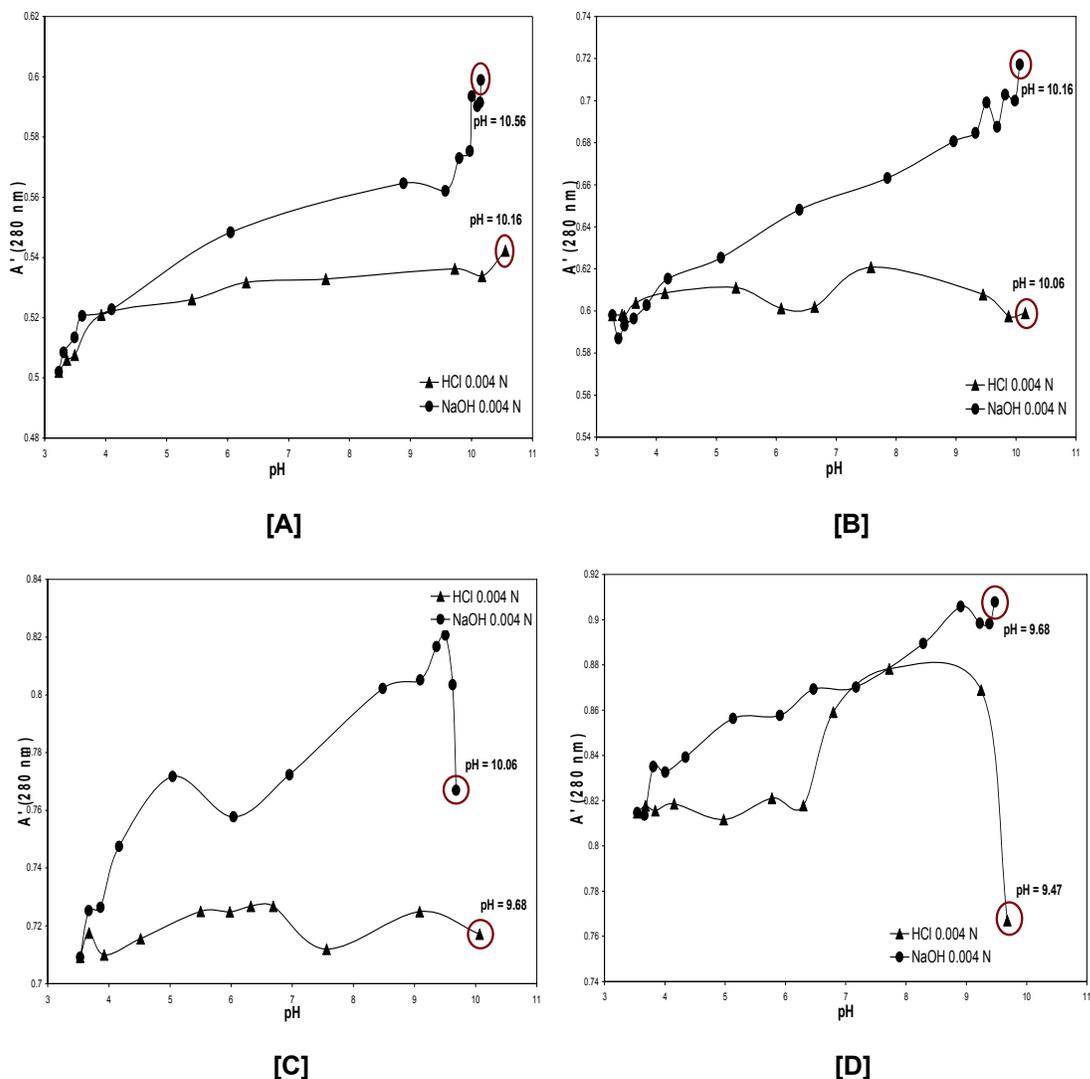


Figura 16. Absorbancias obtenidas a una $\lambda = 280$ nm a diferentes pHs. En la secuencia de titulaciones ácido-base.

Con la variación del pH en la solución del AH-L se pudo observar como afecta a la estabilidad de su estructura al llevarse a cabo la protonación y desprotonación de los grupos funcionales principales ($-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$), pero al mismo tiempo se llevaron a cabo otras modificaciones o reacciones químicas (destrucciones oxidativas, condensación y a su vez ruptura y formación de nuevos enlaces internos) que impidieron llegar a los valores originales.

5.3 EFECTO DE LOS PROCESOS DE SOLUBILIZACIÓN Y PRECIPITACIÓN EN LA ESTABILIDAD DEL ÁCIDO HÚMICO POR MEDIO DE RE-EXTRACCIONES CONTINUAS

Generalmente los estudios relacionados con los AHs se llevan a cabo en solución acuosa empleando técnicas de análisis como UV/Vis y algunas otras en donde se requiere del AH sólido como IRTF y AE, para lo cual es necesario solubilizar y precipitar frecuentemente al AH. Con la finalidad de observar que tanto afecta este proceso a la estructura se realizó la re-extracción de este ácido, obteniendo 4 fracciones diferentes (**AH-II AH-III AH-IV AH-V**) a partir de una muestra original (**AH-I**) como se describe en la metodología 4.1. Este proceso se realizó por duplicado obteniendo dos lotes con cinco fracciones, en ambos procesos los rendimientos de las fracciones fueron muy parecidos: para la fracción AH-II se obtuvo un rendimiento de 61.3%, mientras que para las demás fracciones (AH-III, AH-IV y AH-V) los porcentajes de rendimiento fueron entre un 91 a 95%.

5.3.1 Caracterización de las fracciones obtenidas en el proceso de re-extracción utilizando diferentes técnicas analíticas

5.3.1.1 *Análisis elemental*

Se procedió a realizar el análisis elemental de cada fracción en ambos lotes, expresando los resultados en términos de las relaciones entre átomos a partir de la media obtenida del porcentaje de cada elemento (Tabla 9).

El porcentaje de nitrógeno encontrado en las diferentes fracciones va disminuyendo, sobre todo a partir de la fracción AH-III el cambio es muy notorio, lo que implica moléculas poco resistentes a la hidrólisis efectuada durante el proceso de re-extracción del AH-L (mayor pérdida de N) [1], lo cual indica que en dichas moléculas el N se encuentra situado en los enlaces que unen los núcleos aromáticos o bien en cadenas alifáticas de compuestos amino siendo más fácil de perder en este proceso de solubilización-precipitación.

Tabla 9. Composición elemental de las fracciones obtenidas a partir del AH-L en estudio y las relaciones: H/C y O/C con base en la relación de sus átomos. (valores medios del lote I y lote II).

Fracciones	Composición Elemental				Relación	Relación	Relación
	%C	%H	%N	%O*	C:H:N:O (átomos)	H/C	O/C
AH-I	33.17 (4.73)	2.48 (0.29)	0.44 (4.88)	63.92 (2.43)	88:79:1:127	0.90	1.44
AH-II	47.31 (1.43)	2.56 (1.66)	0.44 (1.63)	49.70 (1.47)	125:81:1:99	0.65	0.79
AH-III	47.64 (2.17)	2.56 (0.00)	0.40 (1.79)	49.41 (2.10)	139:89:1:108	0.64	0.78
AH-IV	49.50 (1.34)	2.53 (0.00)	0.33 (2.18)	47.65 (1.38)	175:107:1:126	0.61	0.72
AH-V	51.08 (3.00)	2.55 (0.83)	0.23 (3.14)	46.16 (3.39)	258:155:1:175	0.60	0.68

(%O* calculado como la diferencia del 100%)

De acuerdo a la Tabla 9 es posible observar por la magnitud de la relación H/C, que al llevar a cabo este proceso de re-extracción cada una de las fracciones obtenidas van aumentando su naturaleza aromática, ya que de acuerdo a la literatura, esta relación es inversamente proporcional a la aromaticidad, siendo que valores ≤ 1 indican un predominante carácter aromático.

Por otro lado, si bien se espera que la relación O/C para AHs provenientes del suelo sea cercana a 0.5, se admite que valores mayores corresponden a AHs con un alto contenido de grupos carboxílicos y/o carbohidratos. Así, en lo que respecta a las fracciones en estudio, la fracción AH-I presenta una mayor cantidad de grupos carboxílicos y/o carbohidratos en comparación con las demás fracciones (AH-II AHIII AHIV AHV). Es interesante resaltar como se va observado una purificación del AH conforme la re-extracción, eliminando aquellas moléculas alifáticas lábiles.

5.3.1.2 Espectroscopia UV/Vis

Por otro lado, cabe aclarar que las soluciones de las cuales se obtuvieron los espectros de absorbancia por UV/Vis tenían una concentración de 10 ppm en todos los casos. Los resultados se presentan en la Tabla 10; como puede observarse, conforme se realizaron las re-extracciones del AH-L se observó un aumento en todos los parámetros de las fracciones ($\epsilon_{(280)}$, % aromaticidad, P.M. y cociente: E_4/E_6), ya que durante la re-precipitación con HCl se está llevando a cabo un proceso de purificación eliminando todas aquellas especies que de alguna forma interfieren o modifican la absorción de la molécula a una $\lambda = 280$ nm. Sin embargo, conforme se aumenta el número de re-extracciones, incrementa el grado de humificación del AH (mayor es la cantidad de grupos fenólicos y carboxílicos), obteniendo un mayor peso molecular y por lo consiguiente, una mayor absorción a la $\lambda = 280$ nm (AH-V).

Tabla 10. Propiedades espectroscópicas de las fracciones del AH-L
(Valores medios del lote I y lote II).

Fracciones	$\epsilon_{(280)}$ (L (mol de CO) ⁻¹ cm ⁻¹)	Aromaticidad	P.M.	E_4/E_6
AH-I	1910.84 ± 0.10	102.28	8114.24	2.24 ± 0.12
AH-II	2543.00 ± 0.10	133.89	10636.57	2.51 ± 0.07
AH-III	2552.22 ± 0.10	134.35	10673.35	2.54 ± 0.11
AH-IV	2663.53 ± 0.10	139.92	11117.47	2.60 ± 0.08
AH-V	2831.45 ± 0.05	148.31	11787.50	2.65 ± 0.04

En la Figura 17-A se representan las absorbancias de las soluciones a $\lambda = 280$ nm en función de las fracciones obtenidas, donde puede observarse un máximo de absorción de las primeras fracciones AH-II y AHIII a partir de la muestra original (AH-I) y en seguida una disminución de la absorción que corresponde a la fracción 4 (AH-IV). Debido a la tendencia que presenta la curva se supuso una degradación del AH en esa fracción, por lo que se optó a realizar nuevamente este proceso con una mayor cantidad de muestra inicial para obtener un mayor número

de fracciones, que permitieran verificar si efectivamente a partir de la fracción AH-IV se está llevando a cabo una descomposición del AH. Por lo tanto, al obtener una fracción más (AH-V), podemos observar en la Figura 17-B que sólo se obtuvieron máximos de absorción en todas las fracciones: AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V a partir de la muestra original (AH-I), prosiguiendo a calcular los valores tal como se muestra en la Tabla 10 para la comparación de las diferentes fracciones.

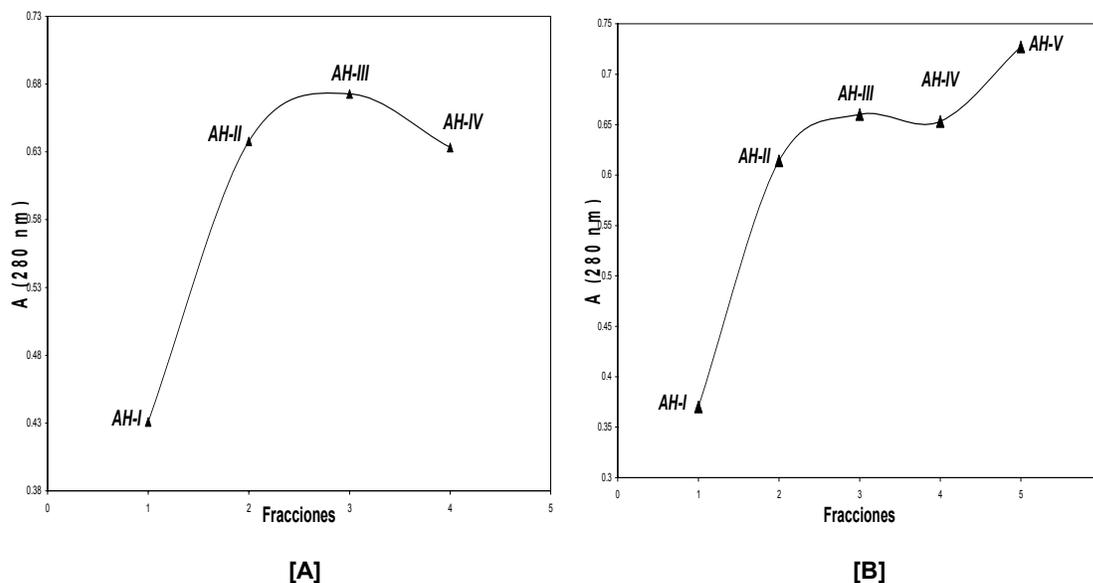


Figura 17. Absorbancias obtenidas a una longitud de onda de $\lambda = 280 \text{ nm}$ de las fracciones: [A] fracción AH-I hasta AH-IV; [B] fracción AH-I hasta AH-V.

5.3.1.3 Espectroscopia de IRTF

Los espectros de IR de las diferentes fracciones (Figuras 18) presentan bandas de absorción que coinciden con los de la muestra original (fracción AH-I), aunque con diferente intensidad, lo que revela que contienen los mismos grupos funcionales (-OH, -COOH, -C=O) [72], pero en diferente proporción.

En los espectros de IR (Figura 18) se pueden observar señales características pero con diferentes intensidades, por lo que se pudiera inferir que se está llevando a cabo la pérdida de agua y de impurezas disminuyendo sus respectivas señales, por otro lado, durante el proceso de re-extracción como ya se mencionó anteriormente, el AH aumenta su grado de humificación, por lo tanto, aumenta la

intensidad de las bandas de absorción del intervalo $3650-3584\text{ cm}^{-1}$ que comprende a los grupos funcionales O-H de los compuestos fenólicos y a su vez, mediante este proceso algunos grupos fenólicos sufren oxidación aumentando ligeramente la banda de absorción en el intervalo $1640-1580\text{ cm}^{-1}$ de grupos carbonilo (C=O), de las cetonas (ceto-enol) y de ácidos carboxílicos.

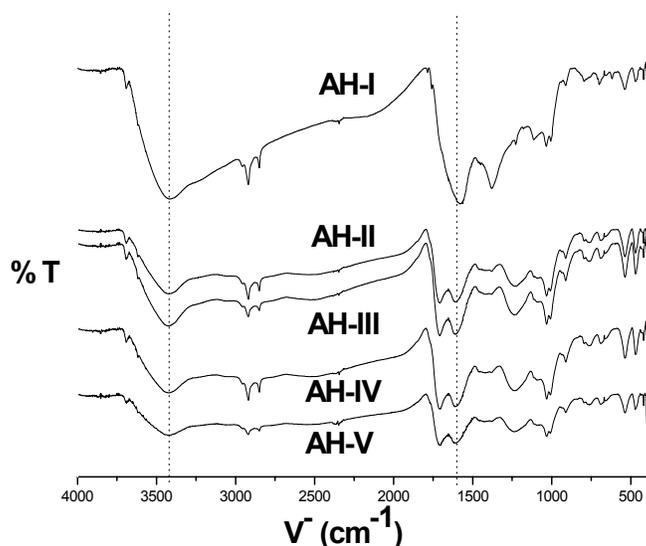


Figura 18. Espectros de IR de las fracciones del AH-L (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AHV), analizadas en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr.

En la Figura 18 se presentan señales características e importantes que hay que resaltar, una es la señal principal de cadenas alifáticas C-H ($2943-2858\text{ cm}^{-1}$ C-H), que conforme se obtienen las fracciones va disminuyendo esta señal, lo cual coincide con la banda característica de los polisacáridos ($1093-1084\text{ cm}^{-1}$ C-O) [80]. Esto comprueba la eliminación de cadenas alifáticas con este proceso de re-extracción.

5.3.1.4 CDB y ATG

En lo que respecta al análisis térmico por dos técnicas como son CDB y ATG de las fracciones en estudio se obtuvieron los termogramas que se presentan a continuación (Figura 19). Con base en los termogramas obtenidos de las respectivas fracciones (AH-I, AHII, AHII, AHIV y AH-V) se presentan los resultados

en la Tabla 11 que son valores de las medias calculadas de los resultados que se obtuvieron tanto del lote I y lote II.

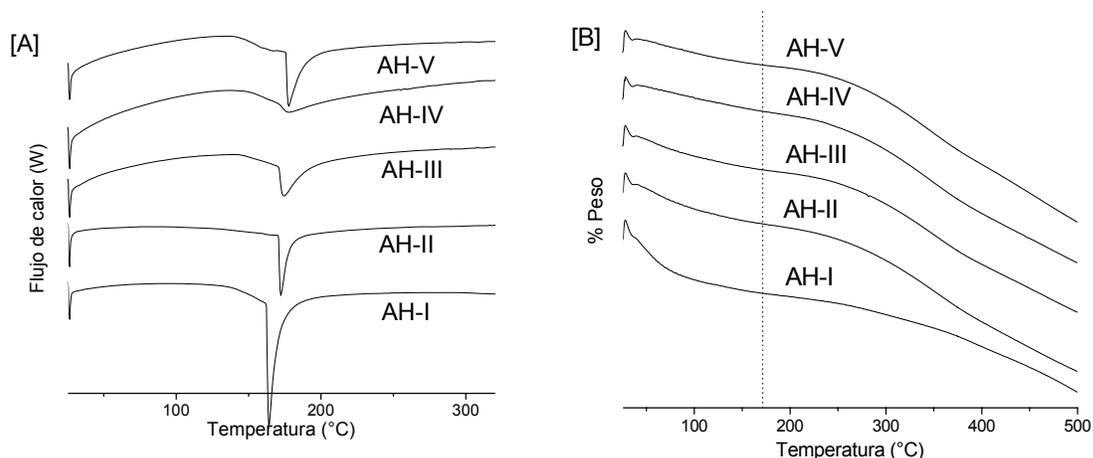


Figura 19. Termogramas de las fracciones AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V: [A] CDB; [B] ATG. Utilizando ≈ 2.0 mg de muestra, portamuestras de aluminio, tasa de calentamiento de $10\text{ }^{\circ}\text{C} / \text{min}$, gas de arrastre: N_2 con un flujo de $20\text{ mL} / \text{min}$ y calibración con Indio.

Tabla 11. Propiedades térmicas de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V por CDB y ATG.

Fracciones	DSC		TGA	
	Ts ($^{\circ}\text{C}$)	ΔH (kJ g^{-1})	Pérdida de agua (%)	Pérdida de masa (%)
AH-I	172.59	-0.16820 ± 0.01	7.32 ± 0.46	7.44 ± 0.69
AH-II	178.03	-0.10886 ± 0.03	5.24 ± 0.71	4.31 ± 0.42
AH-III	178.17	-0.08890 ± 0.04	4.37 ± 0.95	3.33 ± 0.17
AH-IV	181.91	-0.06272 ± 0.00	2.73 ± 0.13	2.44 ± 0.72
AH-V	181.68	-0.07964 ± 0.02	4.00 ± 0.11	2.57 ± 0.76

Ts: temperatura de la señal máxima en $^{\circ}\text{C}$ obtenida por CDB.

Como se muestra en los termogramas por CDB de cada una de las fracciones, la señal máxima endotérmica se ubica en un intervalo de temperatura de 110-210°C. Según datos reportados en la literatura se trata de evaporación constante de agua y de pequeñas moléculas orgánicas (como grupos carboxílicos) [73-74]. De la comparación de los termogramas de CDB con el ATG se determinaron las pérdidas de masa que se muestran en la Tabla 11. De ahí se puede concluir que con las re-extracciones del AH-L existe una pérdida de agua mayor y de masa total de la primera a la segunda fracción, mientras que las diferencias entre la segunda a la cuarta se hacen menos pronunciadas. Con estos estudios también podemos confirmar que la muestra inicial (AH-I) es más inestable debido a las impurezas que presenta (mayor pérdida de masa), mientras se van realizando las extracciones va aumentando su estabilidad (menor pérdida de masa). Nuevamente el AH-V se aparta de los otros comportamientos, al incrementar su pérdida de masa, esto se debe a que está perdiendo agua que se encuentra formando puentes de hidrógeno en la parte más interna de la estructura del AH. Todo esto coincide con los resultados obtenidos en el análisis espectroscópico.

5.3.1.5 Acidez total y cantidad de grupos carboxílicos y fenólicos

Por la presencia de los grupos funcionales principales carboxílicos (-COOH) y fenólicos se pudo determinar las propiedades ácidas y la capacidad de intercambio catiónico de dichas fracciones. La acidez total de los grupos -COOH y -OH se determinó por el método de Ba(OH)₂ (barita cáustica) a pH > 13 y para la determinación de grupos -COOH se utilizó el método de Ca(CH₃COO)₂ basándose ambos métodos en el intercambio de protones (H⁺) del AH. Los resultados del análisis se muestran en la Tabla 12.

Del análisis de las Tabla 12 es posible observar como al llevar a cabo el proceso de re-extracción la acidez total va aumentando y al mismo tiempo la cantidad de grupos carboxílicos, nuevamente se comprueba una auto-oxidación de la molécula de AH, también podemos observar como en la fracción I se tiene una mayor cantidad de grupos -OH con respecto a grupos -COOH, pero conforme aumentan

los grupos $-\text{COOH}$ disminuyen los grupos $-\text{OH}$ hasta la fracción III y posteriormente, a partir de la fracción IV se regeneran los grupos fenólicos llegado el momento que los valores obtenidos de ambos grupos se igualan. Mediante este proceso se pudo notar como se esta oxidando la molécula del húmico en condiciones alcalinas con el proceso de re-extracción y bajo condiciones normales de trabajo. Como podemos observar en la tabla siguiente.

Tabla 12. Acidez total y cantidad de grupos funcionales ($-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$) en las fracciones del AH-L.

Muestra	Acidez de Carboxílicos (meq g^{-1})	Acidez de Fenólicos (meq g^{-1})	Acidez Total (meq g^{-1})
AH-I	0.55 ± 0.04	2.48 ± 0.15	3.03 ± 0.11
AH-II	3.59 ± 0.28	1.34 ± 0.02	4.93 ± 0.25
AH-III	4.76 ± 0.10	0.57 ± 0.24	5.33 ± 0.14
AH-IV	5.27 ± 0.09	5.41 ± 0.05	10.68 ± 0.14
AH-V	5.66 ± 0.32	5.34 ± 0.59	11.00 ± 0.28

Con los resultados obtenidos nuevamente se comprueba y se confirma como el proceso de re-extracción no sólo está purificando al AH, sino también está sufriendo diferentes modificaciones estructurales la molécula del ácido por la hidrólisis.

5.3.2 Cinéticas en solución acusa de las fracciones de AH mediante espectroscopia UV/Vis

Con la finalidad de observar la cinética de las diferentes fracciones en solución y calcular los parámetros espectroscópicos como: coeficiente absortividad molar (ϵ_{280}), porcentaje de aromaticidad, peso molecular promedio y el cociente E_4/E_6 , para obtener una mayor información estructural del AH. Se registraron las absorbancias de interés de los espectros de absorción, graficando solamente las absorbancias a una longitud de onda de 280 nm (Figura 20), ya que a esta longitud de onda ocurren las transiciones electrónicas $\pi - \pi^*$ de las sustancias fenólicas, derivados de anilina, ácidos benzoicos, polienos e hidrocarburos policíclicos aromáticos, grupos característicos y principales de los AH [60-61].

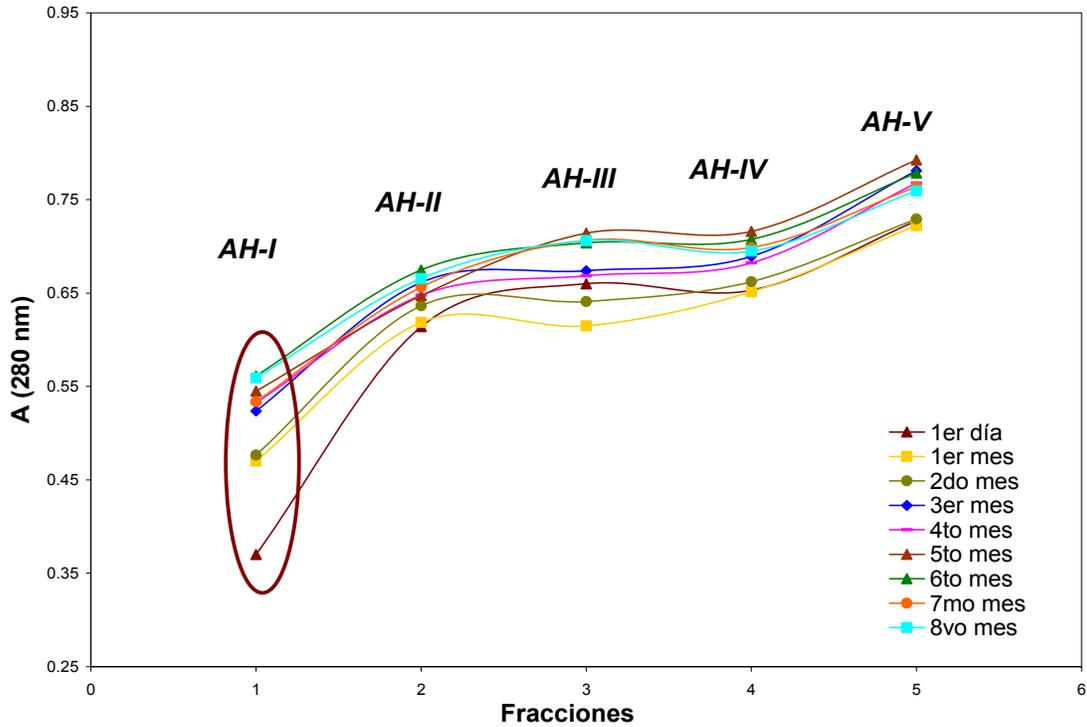


Figura 20. Absorbancias obtenidas a una longitud de onda de $\lambda = 280$ nm de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V en diferentes tiempos. Concentraciones: 10 ppm.

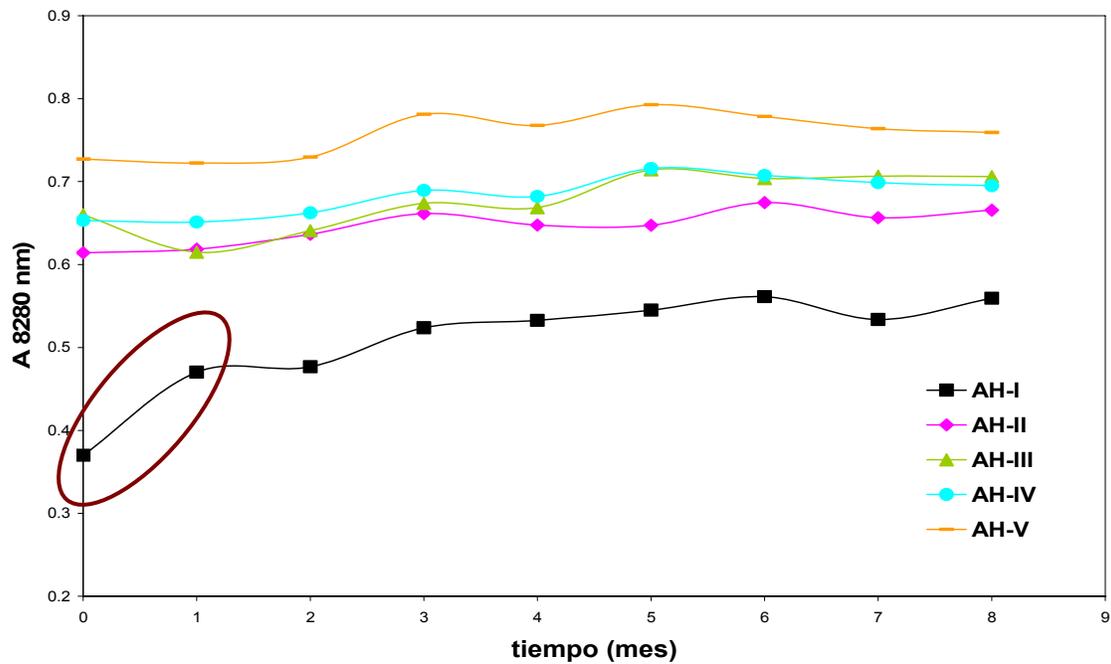


Figura 21. Absorbancias obtenidas ($\lambda = 280$ nm) de las fracciones: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V con respecto al tiempo. Concentraciones: 10 ppm.

En las Figuras 20 y 21 podemos observar que la fracción AH-I presenta una mayor inestabilidad en comparación con las demás (lo cual se confirma con el termoanálisis) (AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V); de igual forma se observa la cinética de las diferentes fracciones sobre todo comparando el primer día con el 4to mes de análisis. En los meses restantes después del 4to se pudo observar una mayor estabilidad en las absorbancias obtenidas de las diferentes muestras. Las modificaciones que va presentando la macromolécula del AH cada vez son en tiempos más alejados, comparados con los valores de los primeros meses, en los cuales presentan cambios más notorios. Es importante mencionar que el AH es más inestable en el primer mes, es cuando la macromolécula se modifica más fácilmente. A continuación se presenta una tabla en donde aparecen los porcentajes de aromaticidad de estas fracciones en estudio en los diferentes meses (Tabla 13).

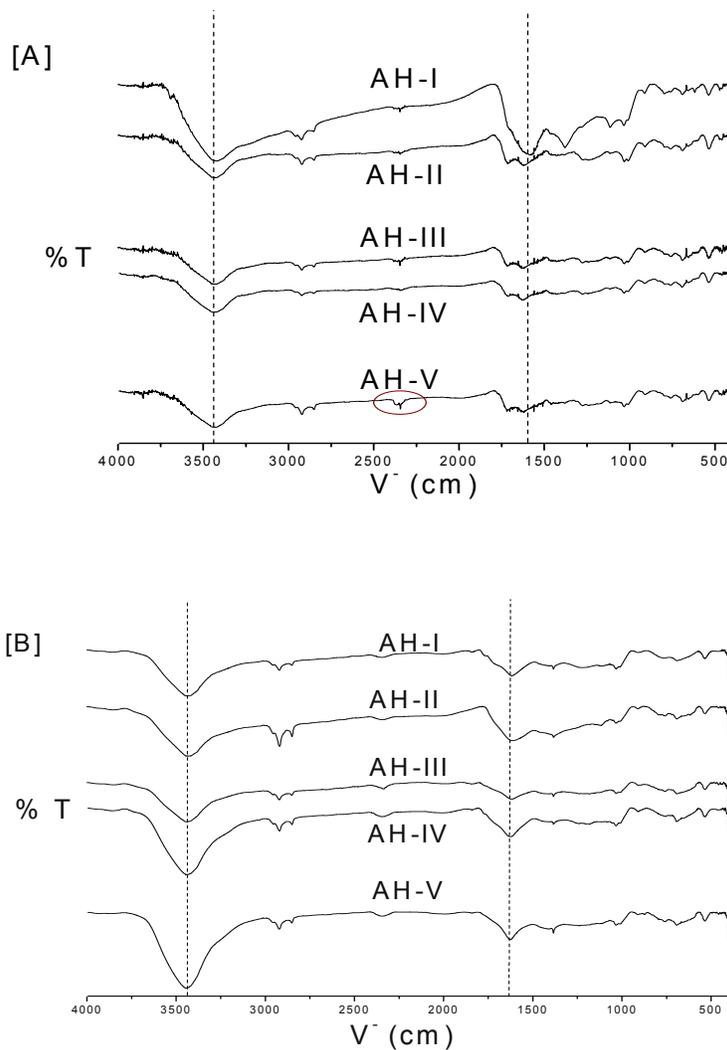
Tabla 13. Porcentajes de aromaticidad de las fracciones del AH-L en diferentes meses.

Fracciones	Aromaticidad (%)				
	1er día	1er mes	2do mes	3er mes	4to mes
AH-I	74.03	92.23	93.40	101.97	103.61
AH-II	118.39	119.21	122.46	127.01	124.50
AH-III	126.74	118.54	123.27	129.26	128.30
AH-IV	125.50	125.17	127.15	132.08	130.77
AH-V	138.97	138.08	139.37	148.75	146.32

De los diferentes parámetros calculados ($\epsilon_{(280)}$, peso molecular promedio y cociente: E_4/E_6), solo se presenta el % de aromaticidad (Tabla 13), ya que todos los parámetros de las fracciones fueron aumentando a la misma proporción. Con estos resultados podemos concluir que con el proceso de solubilización-precipitación se está llevando a cabo una purificación, a la par de un proceso de auto-oxidación y de polimerización, aumentando su grado de humificación.

5.3.3 Termo-análisis en sólido de las fracciones por CDB y IRTF

Se realizaron tres tipos de experimentos como ya fueron descritos en la metodología 4.1.2, sometiendo las diferentes fracciones a cierta temperatura controlada por CDB, en donde, la temperatura inicial ($T_{inicial}$) fue de 25 °C para los tres experimentos, variando en cada uno de ellos la temperatura final (T_{final}) que fueron: 150, 300 y 500 °C, posteriormente, se analizaron cualitativamente por IR las bandas de los diferentes grupos funcionales principales a partir de los espectros que se presentan en la siguiente figura:



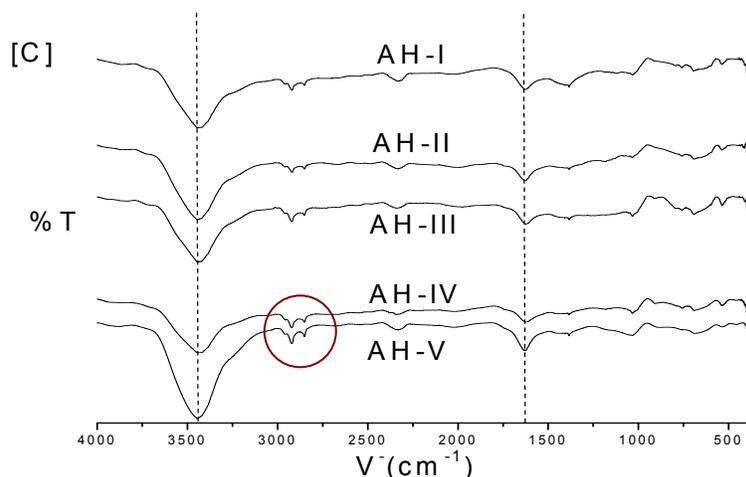


Figura 22. Espectros de IR de las fracciones del AH-L (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AHV), analizadas en pastilla: con 2.0 mg de muestra en 200 mg de KBr. Después de un tratamiento térmico por CDB de: [A] 25 a 150 °C, [B] 25 a 300 °C y [C] 25 a 500 °C.

Los espectros de IR (Figura 22) permiten observar cualitativamente las bandas de los grupos principales, en este caso se puede observar que a mayor temperatura disminuye la intensidad de la mayoría de las bandas por pérdida de agua y de pequeñas moléculas orgánicas sobre todo ácidos carboxílicos, pero va aumentando la intensidad de las bandas de absorción del intervalo de **3650-3584 cm⁻¹** que comprende a los grupos -OH de los compuestos fenólicos y del intervalo **1640-1580 cm⁻¹** del carbonilo (C=O) de las cetonas (ceto-enol), ocurriendo una oxidación directa de algunos grupos fenólicos. Por otro lado, se observa de forma muy tenue las bandas de sobre tono de los grupos aromáticos en el intervalo **2500-2000 cm⁻¹** sobre todo en los espectros de la Figura 22-C, de igual forma van aumentando las intensidades de las bandas de los grupos metilenos en el intervalo **3000-3100 cm⁻¹** como se muestra en la figura anterior, lo que se debe a un aumento en el grado de humificación del AH debido a la temperatura.

5.4 ESTIMACIÓN DE LAS CONSTANTES DE EQUILIBRIO DE COMPLEJACIÓN DE LOS AHs Y LAS FRACCIONES: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV Y AH-V CON Cu (II) Y Pb (II)

Con los resultados obtenidos en el análisis de las muestras de *AH-Metal* por espectroscopia de Absorción Atómica, realizando los cálculos correspondientes para obtener los valores de las constantes de equilibrio y tomando en cuenta las consideraciones mencionadas en el apartado 4.5 se obtienen los resultados que se presentan a continuación.

El procedimiento descrito y los cálculos mencionados se realizaron para cada uno de los AHs y para cada fracción (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V) del lote I y lote II. Por otro lado, a partir de la representación de $\log(\lambda_0 / \lambda - 1)$ contra las diferentes concentraciones de AH se presenta una linealidad de los diferentes valores, ajustando el modelo y obteniendo la ordenada al origen que es la constante de equilibrio de formación del complejo (**log K**) con una pendiente ≈ 1 para todos los casos (con una relación estequiométrica: 1:1), como se observa en las Figuras 23, 24, 25 y 26.

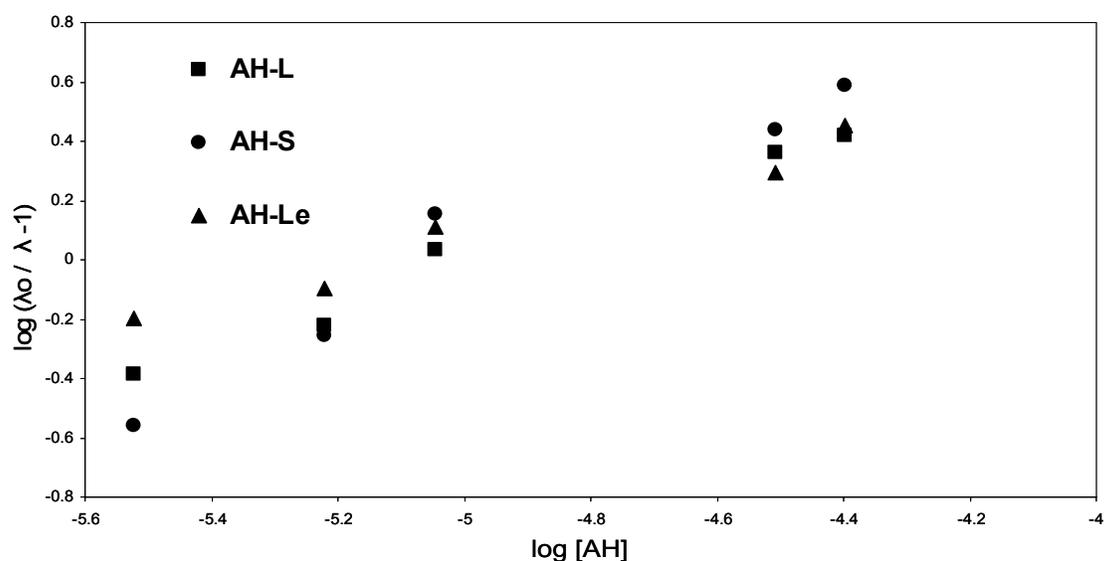


Figura 23. Curvas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH-Cu²⁺ para los AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído (AH-S).

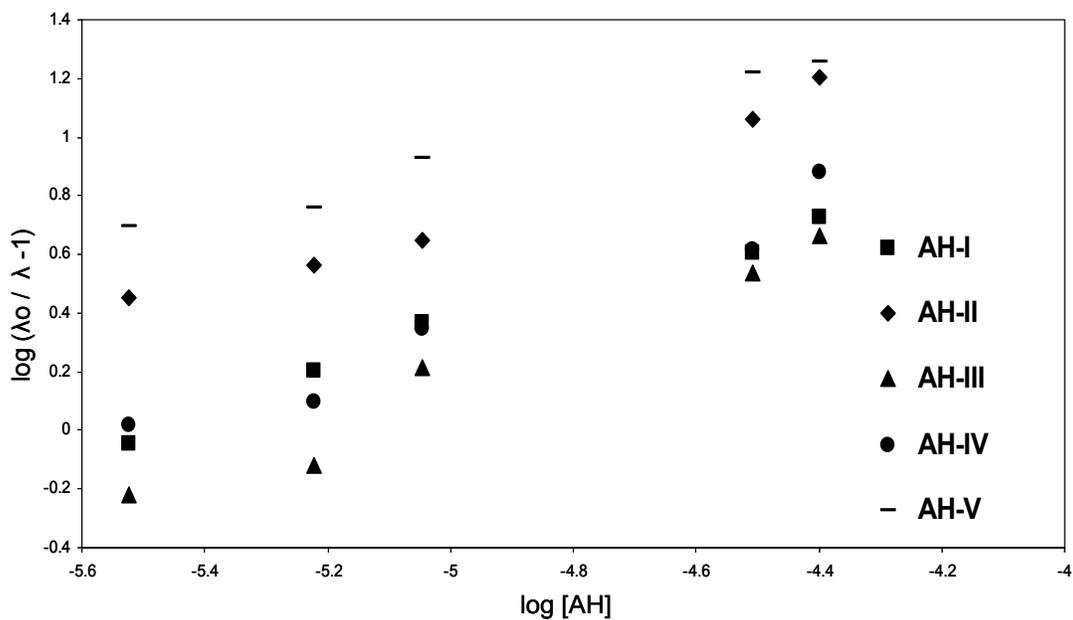


Figura 24. Curvas representativas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH-Cu²⁺ de cada fracción obtenida (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V) del AH-L.

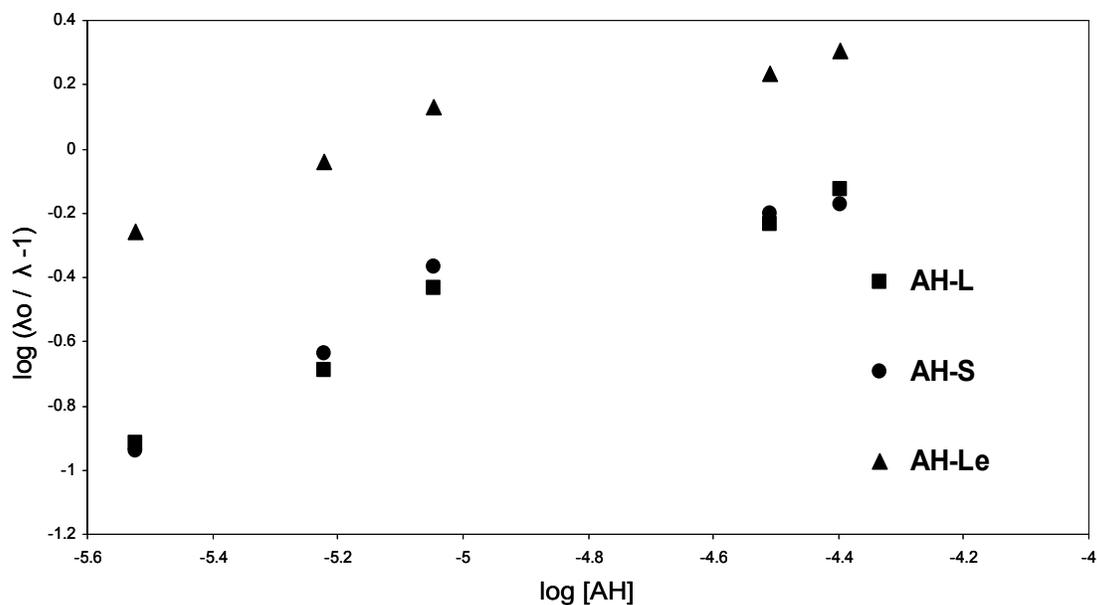


Figura 25. Curvas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH-Pb²⁺ para los AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído (AH-S).

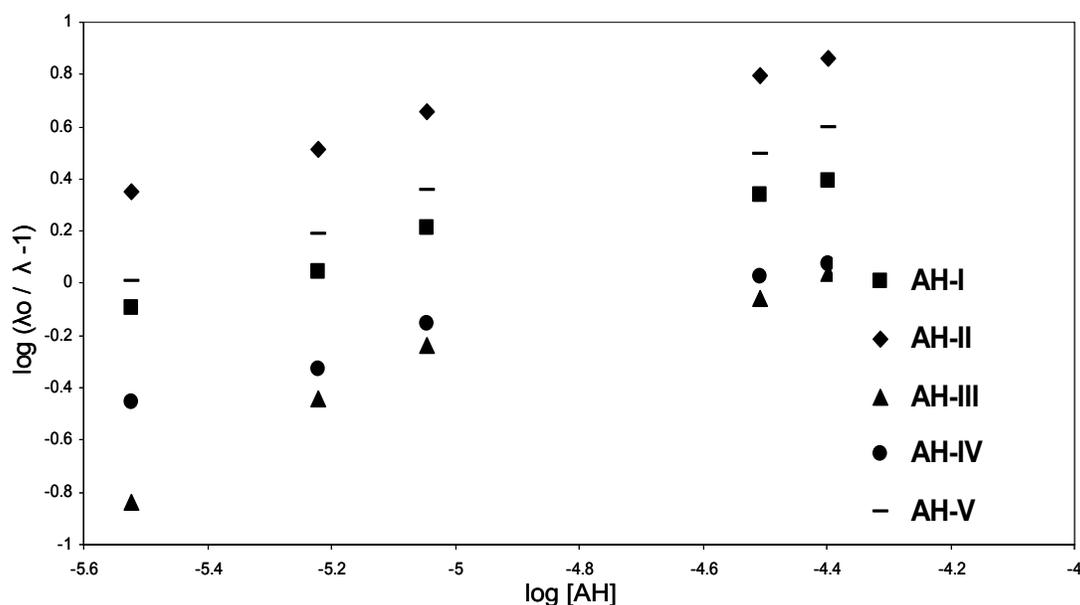


Figura 26. Curvas representativas para la obtención de la constante de estabilidad de los complejos AH-Pb²⁺ de cada fracción obtenida (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V) del AH-L

Los respectivos valores de las constantes de equilibrio se presentan en las siguientes tablas:

Tabla 14. Valores estimados de la interacción de Cu²⁺ y Pb²⁺ con AHs comerciales (AH-Le y AH-L) y el AH extraído del suelo (AH-S).

Muestra de AH	log K* _{Cu (II)}	log K* _{Pb (II)}
AH-Le	2.87 ± 0.05	2.23 ± 0.15
AH-L	3.75 ± 0.14	2.75 ± 0.12
AH-S	4.75 ± 0.24	2.60 ± 0.20

*Cálculo de la desviación estándar para un total de dos análisis

Tabla 15. Valores estimados de la interacción de Cu²⁺ y Pb²⁺ con cada fracción del AH-L: AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V.

Muestra de AH	log K* _{Cu (II)}	log K* _{Pb (II)}
AH-I	3.67 ± 0.17	2.14 ± 0.15
AH-II	4.14 ± 0.04	2.63 ± 0.19
AH-III	4.28 ± 0.15	3.22 ± 0.07
AH-IV	3.86 ± 0.25	2.27 ± 0.15
AH-V	3.49 ± 0.18	2.82 ± 0.09

*Cálculo de la desviación estándar para un total de dos análisis

De acuerdo con los resultados obtenidos en la Tabla 14 se observa que el AH extraído en el laboratorio (AH-S) presenta una mayor complejación con el Cu^{2+} , lo cual se atribuye al método de extracción empleado (se obtiene al AH con una mayor pureza) comparado con los AHs comerciales, y de acuerdo a los análisis de caracterización presentó mayor cantidad de grupos funcionales fenólicos y carboxílicos, a través de los cuales puede darse la complejación. Es importante mencionar y considerar que el metal Cu^{2+} también se puede complejar con el nitrógeno, teniendo un mayor porcentaje nuevamente el AH-S. Por otro lado, la interacción que presentan los diferentes AHs con Pb^{2+} no se observan diferencias significativas, sin embargo, se presenta una mayor interacción con el AH-L. Es importante señalar que los diferentes valores obtenidos del AH-L y AH-S eran muy similares con respecto a los obtenidos con el AH-Le.

En las fracciones obtenidas (Tabla 15) la constante de equilibrio tanto con el metal Cu^{2+} como con el Pb^{2+} van aumentado hasta la fracción AH-III, posteriormente van decreciendo, lo cual se atribuye que en las fracciones AH-IV y AH-V la estructura del AH está sufriendo una hidrólisis y por consecuente pierde átomos de nitrógeno a través de los cuales puede darse un grado importante de complejación, a parte de los grupos funcionales principales: $-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$. Hasta el momento se ha comprobado que las modificaciones en sus propiedades químicas corresponden no sólo a un proceso de purificación, sino a reacciones que aumentan el grado de humificación y autooxidación que involucran sobre todo a los grupos fenólicos hasta llegar a una polimerización, logrando una mayor estabilidad estructural en las diferentes fracciones. Esta deducción es importante ya que algunos estudios de elucidación estructural de AHs se basan en la re-extracción y análisis subsecuente de fracciones donde no se cercioran sobre la estabilidad del AH.

Por otro lado, es importante mencionar y resaltar en este apartado, que se realizaron experimentos previos de una muestra de AH comercial (chemapex), desarrollando inicialmente un método por electroforesis capilar (EC) que fuera reproducible (parámetros utilizados: el capilar de sílice fundida, $L_t = 39$ cm, $L_d =$

28.5 cm, d.i.= 50 μm y el buffer ác. bórico / Tris / EDTA pH = 8.5 y de acetatos pH = 3.0 y 4.0), con el objeto de lograr mejores separaciones y a su vez estudiar la interacción AH-Metal (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}).

Una vez que se logró reproducir el método adecuadamente con los parámetros ya mencionados, se llevaron a cabo dos tipos de experimentos como se describen en el **Anexo**, todo esto con el fin de seguir los cambios en los electroferogramas y calcular las movilidades electroforéticas del metal con respecto al AH; los resultados obtenidos se introdujeron en el programa computacional SQUAD, el cual basa los cálculos en la minimización de la suma de los cuadrados de las diferencias entre las movilidades efectivas experimentales $\mu_{\text{eff, exp}}$ y las movilidades calculadas $\mu_{\text{eff, calc}}$, obteniendo los valores estimados de las constantes de equilibrio. Se pudo concluir que la afinidad del metal con el AH a pH 3, 4 y 8.5 decrece en el siguiente orden: $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Hg}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. En lo que se refiere a Cu^{2+} y Pb^{2+} , metales que se analizaron por el método por intercambio iónico con las muestras de AH-Le, AH-L y AH-S, sus valores de las constantes de complejación son muy parecidos (Cu^{2+} log K = 3.62) (Pb^{2+} log K = 3.48), siendo el orden de interacción el mismo por ambos métodos ($\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$).

Capítulo 6. Conclusiones y perspectivas

6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se concluye que con el método de extracción utilizando $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e NaOH como agentes extractantes, se excluye un prolongado proceso de descalcificación (sobre todo en el caso de suelos carbonatados), por lo tanto, el tratamiento es mucho más rápido y eficiente, aunque no es recomendable para suelos muy mineralizados. Por otro lado, el AH-S extraído con $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ e NaOH se observaron pocas alteraciones en su macromolécula, confirmado esto con los resultados obtenidos y comparados con los AHs comerciales con los que se estuvo trabajando y con resultados consultados en la literatura.

Analizando y estructurando la relación de todos los resultados obtenidos en la caracterización se llega a la conclusión que el AH-S es el que presenta un menor porcentaje de aromaticidad (grado de humificación) y peso molecular, pero un mayor grado de acidez que se atribuye a la cantidad de grupos funcionales (COOH y OH), por lo tanto, presenta una mayor C.I.C en comparación con el AH-Le y AH-L. En su contenido de nitrógeno presentó un mayor porcentaje, lo cual indica que en dichas moléculas el N se encuentra situado en los anillos aromáticos siendo muy difícil extraerlo en la hidrólisis. Por lo tanto, se concluye que este AH-S es más alifático y poliácido comparado con el AH-Le y AH-L.

El AH-Le es el que presentó un mayor porcentaje de aromaticidad (grado de humificación), Sin embargo, el porcentaje de nitrógeno encontrado en el AH-Le y AH-L analizados indica que en dichas moléculas el N se encuentra situado en los enlaces que unen los núcleos aromáticos o bien en las cadenas alifáticas siendo muy fácil extraerlo en la hidrólisis. Por otro lado, el AH-L presenta firmes uniones complejas con metales que sustituyen al hidrógeno, reafirmando este resultado con el porcentaje de oxígeno, contenido de cenizas y con la acidez total; haciendo mención que la cantidad de grupos carboxílicos es mayor para dicho ácido. Por medio de los resultados derivados del ATG y CDB podemos concluir que a las temperaturas de transición obtenidas se lleva a cabo la pérdida de agua química

de las moléculas de los diferentes AHs en estudio. Esto queda definido por la movilidad de las cadenas del AH por encima del valor de la temperatura de transición, también es importante mencionar que el AH-Le y AH-L son muy estables, debido a que no presentaron otra señal en sus termogramas, sólo la señal de la pérdida de agua química, por lo que nos indica que toda su estructura está muy compacta con gran cantidad de grupos aromáticos y muy pocas cadenas alifáticas que además se encuentran en la parte interna de su estructura, por lo tanto no son compuestos lábiles. Sin embargo, como se indicó en los resultados el AH-S si presenta otra señal, confirmando nuevamente y concluyendo que el AH-S es más alifático.

En los estudios del efecto del pH en la macromolécula del AH-L, se observa que entre más ácida esté la solución de AH habrá un aumento de grupos funcionales (COOH y OH) que al desprotonarse a pHs básicos aumentan la carga negativa y la deslocalización de electrones en los diferentes anillos aromáticos (aumentan las transiciones $\pi-\pi^*$ a la longitud de onda de $\lambda=280$ nm). Desafortunadamente en solución acuosa, el AH parece sufrir una descomposición o empieza a llevar a cabo una serie de reacciones como condensaciones de amino-carbonilos y llegar a una polimerización cuando el pH se revierte a valores mayores.

En lo que se refiere a las re-extracciones del AH-L, hasta el momento se ha visto que las primeras fracciones parecerían corresponder sólo a un proceso de purificación; sin embargo, en re-extracciones posteriores es probable que la macromolécula sufra una degradación. No obstante, esto último se comprobó mediante nuevas re-extracciones y la obtención de un mayor número de fracciones. Llegando a la conclusión que las modificaciones en sus propiedades químicas corresponden no sólo a un proceso de purificación, sino a reacciones que aumentan el grado de humificación y autooxidación que involucran sobre todo a los grupos fenólicos hasta llegar a una polimerización, logrando una mayor estabilidad estructural en las diferentes fracciones. Esta deducción es importante ya que algunos estudios de elucidación estructural de ácidos húmicos se basan en

la re-extracción y análisis subsecuente de fracciones donde no se cercioran sobre la estabilidad del AH.

En las cinéticas en solución acuosa de las diferentes fracciones obtenidas en el proceso de re-extracción (AH-I, AH-II, AH-III, AH-IV y AH-V), se observó que en el primer mes presentan mayores modificaciones estructurales. Posteriormente, hasta el cuarto mes se observó una mayor estabilidad de la macromolécula. Otro aspecto importante es que la fracción 1 fue la que muestra mayor inestabilidad química con respecto a las demás fracciones. Por otro lado el análisis cualitativo desarrollado por CDB y IRTF se confirma como la macromolécula del AH se ve alterada al aplicar cambios en su temperatura aumentando su grado de humificación lo que se conoce como envejecimiento de la molécula.

De manera general se observó que el método de extracción empleado para el AH-S presenta buenos resultados y una vez más se confirma con el valor obtenido de la constante de equilibrio; por otro lado, aunque el proceso de re-extracción ayuda a purificar el AH hasta la fracción AH-III (aumentando el valor de la constante de equilibrios con Cu y Pb), purificaciones sucesivas tal y como se recomiendan en procesos de extracción de ácidos húmicos, pueden afectar a la molécula hidrolizándola y cambiando radicalmente su capacidad complejante. Se concluye que en el proceso de complejación AH-Metal la interacción se presenta en el siguiente orden: $\text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+}$.

Como ya se mencionó al inicio y consecuentemente se ha resaltado en los apartados de esta tesis, la importancia que presentan los estudios realizados de estabilidad (característica fundamental y poco investigada) de los AHs. Los cuales, estos análisis (temperatura, tiempo, pH, método de extracción, proceso de solubilización-precipitación y la interacción con metales), se pueden tomar como una base o referencia antes de utilizar estos ácidos en diversas aplicaciones y usos, es decir, cada uno de estos estudios ayudaran a decidir en que condiciones se requiere al AH o en que parámetros de pH, tiempo, temperatura, re-extraído, en

sólido o en solución, para que sea de beneficio para su correspondiente aplicación.

En las perspectivas se pueden evaluar otros métodos de extracción, analizando y caracterizando por diferentes técnicas analíticas cada muestra obtenida de AH extraído, con el fin de observar cual fue el más modificado en su estructura y que tanto repercute el agente extractante, por otro lado, analizar otras muestras de AH con el proceso de solubilización-precipitación en re-extracciones continuas para verificar si el comportamiento de estos nuevos ácidos es el mismo que el analizado en este trabajo. Evaluar la interacción *AH-Metal* con otros metales utilizando el mismo método desarrollado, para analizar esa interacción calculado sus respectivas constantes de equilibrio de complejación y compararlos con los metales ya utilizados en este trabajo que fueron: Cu(II) y Pb(II).

Capítulo 7. Referencias

7. REFERENCIAS

- 1 M.M. Kononova, *Materia Orgánica del Suelo*. Oikos-tau, s.a. – ediciones. Apartado 5347 – Barcelona. Vilassar de mar – Barcelona España. **1982**, p. 63-105.
- 2 S.A. Waksman, *Humus: Origin, Chemical Composition and Importance in Nature*. Williams and Co Wilkins, Baltimore, **1938**.
- 3 W. Flaig, *The chemistry of humic substances*, in *The use of isotopes in soil organic matter studies*, Report of FAO/IAEA Technical Meeting. Pergamon, New York, **1966**, p. 103.
- 4 G. Davies, E.A. Ghabbour, *J. Chem. Educ.* **2001**, 78, 1609-1614.
- 5 R.S. Swift, Organic matter characterization. In D.L. Sparks et al. (eds) *Methods of soil analysis. Part 3. Chemical methods*. Soil Sci. Soc. Am. Book Serie: 5 Soil Sci. Soc. Am. Madison, WI. **1996**, (chap 35), p. 1018-1020.
- 6 J. Novák, J. Kozler, P. Janos, J. Ceziková, V. Tokarová, L. Madronová, *React. Funct. Polym.* **2001**, 47, 101-109.
- 7 L. Madronová, J. Kozler, Jirina, Ceziková, Jaromír Novák, P. Janos, *React. Funct. Polym.* **2001**, 47, 119-123.
- 8 Dragunov, Melikov, Tulinov, *Yad. Fiz.* **1966**, 4, 314.
- 9 F.J. Stevenson, *Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reactions*. Willey Interscience, New York, **1982**.
- 10 H.R. Schulten, J. Fresenius. *Anal. Chem.* **1995**, 351, 62.
- 11 R.S. Swift, *Soil Sci.* **1999**, 164, 790-802.
- 12 J. Burdon, *Soil Science.* **2001**, 166, 752-769.
- 13 R. Sutton, G. Sposito, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 9009-9015.
- 14 M. Young, C. Steelink, *Phytochemistry*, **1973**, 12, 2851-2862.
- 15 G. Davies, A. Fataftah, A. Cherkasskiy, E.A. Ghabbour, A. Radwan, A.S. Jansen, S. Kolla, M.D. Paciolla, L.T. Sein, W. Buermann, M. Balasubramanian, J. Budnick, B. Xing, *Chem. Soc. Dalton Trans.* **1997**, 4047-4060.
- 16 M.D. Paciolla, S. Kolla, L.T. Sein, J.M. Varnum, D.L. Malfara, G. Davies, E.A. Ghabbour, S.A. Jansen. In *Humic Substances: Structures, Properties and Uses*; op cit., pp 203-214.
- 17 S.M. Shevchenko, G.W. Bailey, *J. Mol. Struct. (Theochem)*. **1998**, 422, 259.
- 18 L.T. Sein, J.M. Varnum, S.A. Jansen, *Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 546-552.
- 19 R.V. Reyes, E. Arguello, H. Ayazo, *Real Academia de Ciencias. Zaragoza.* **2007**, 62, 99-117
- 20 M.S. Diallo, A. Simpson, P. Gassman, J.H. Jonson, W.A. Goddard, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 1783-1793.
- 21 Bonh, et. al. *Química del suelo*. Trad. M. Sánchez, R. Guajardo, *Ed Limusa, México.* **1993**.

- 22 P. Lubal, D. Siroky, D. Fetsch, J. Havel, *Talanta*, **1998**, 47, 401.
- 23 P. Lubal, D. Fetsch, D. Siroky, M. Lubalová, J. Senkyr, J. Havel, *Talanta*, **2000**, 51, 977.
- 24 B. Gevao, K.T. Semple, K.C. Jones, *Environ. Pollution*, **2000**, 108, 3.
- 25 J.R. Lead, K. Starchev, K.J. Wilkinson. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 482-487.
- 26 M.N. Chan, C.K. Chan. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 37, 5109-5115.
- 27 E. Tipping, West Nyack, N.Y. USA: *Cambridge University Press*. **2002**.
- 28 A. Limbeck, M. Handler, B. Neuberger, B. Klatzer, H. Puxbaum. *Analytical Chemistry*. **2005**, 9, 164-1060.
- 29 M. Schnitzer, *Soil Sci.* **1991**, 151, 41-58.
- 30 W. Pflug, W. Ziechman, *Biochem.* **1982**, 14, 165.
- 31 G. Davies, E.A. Ghabbour, *J. Chem. Educ.* **2001**, 78, 1609-1614.
- 32 F. Crespilho, V. Zucolotto, J. Siquiera, C.J.L. Constantino, F.C. Nart, O.N. Oliveira, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 5385-5389.
- 33 I. Galeska, T. Hickey, F. Moussy, D. Kreutzer, F. Papadimitrakopoulos, *Biomacromolecules* **2001**, 2, 1249-1255.
- 34 C.Y. Tang, J.O. Leckie, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 4767-4773.
- 35 C. Plaza, G. Brunetti, N. Senesi, A. Polo, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, 20, p.6.4.
- 36 C. Andre, M. Thomassin, A. Berthelot, Y. C. Guillaume, *Analytical Chemistry*, **2005**, p. 9.3.
- 37 A.R. Khwaja, P.R. Bloom, P.L. Brezonik, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, 20, p.5.6.
- 38 C. Lamelas, V.I. Slaveykova, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 4172-4178.
- 39 Z. He, S.J. Traina, L. Weavers, *Environ. Sci. Technol.* **2007**, 41, 779-784.
- 40 T. Liu, D.C.W. Tsang, I.M.C. Lo, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 2092-2098.
- 41 M.L. Pacheco, Tesis de Doctorado, Brno, República Checa, **2002**.
- 42 G.A. Braun, U. Lankes, F.H. Frimmel, *Aquatic Sciences*, **2004**, 66, 151-170.
- 43 A.J. Prentice, E.A. Webb, *Geoderma*. 2010, 155, 1-9.
- 44 C. Zaccone, P. Soler, C. Plaza, C. Cocozza, T.M. Miano, *J. of Hazardous Materiales*. **2009**, 167, 987-994.
- 45 www.ihss.gatech.edu. (Enero de **2006**).
- 46 M. Abad, *Bioresource Technology*. **1994**, 47, 103-106.
- 47 B. Varga G. Kiss, I. Galambos, A. Gelencsear, J. Labia, Z. KrivaacsyK, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 3303-3306.
- 48 S.L. Phillips, S.V. Olesik, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 5544-5553.
- 49 K. Wrobel, B.B.M. Sadi, K. Wrobel, J.R. Castillo, J.A. Caruso, *Anal. Chem.* **2003**, 75, 761-767.
- 50 W. Yuan, A.L. Sydney, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 5043-5050.

- 51 L. Carlsen, P. Bo, G. Larsen, *Geochemical Behavior of Disposed Radioactive Waste*, Chapter 10. **1984**, pp 167-178.
- 52 D. Smejkalová, A. Piccolo, *J. Biomacromolecules*, **2005**, 6, 2120-2125.
- 53 P.S. Kopplin, N. Hertkorn, H.R. Schulten, A. Kettrup, *J. Environ. Sci. Technol.* **1998**, 32, 2531-2541.
- 54 Y. Nagata, K. Hiral, H. Bandow, Y. Maeda, *J. Environ. Sci. Technol.* **1996**, 30, 1133-1138.
- 55 M.J. Avena, K.J. Wilkinson, *Environ. Sci. Technol.* **2002**, 36, 5100-5105.
- 56 C. Plaza, N. Senesi, A. Polo, G. Brunetti, *J. Environ. Sci. Technol.* **2005**, 39, 7141-7146.
- 57 A.P. Robertson, J.O. Leckie, *J. Environ. Sci. Technol.* **1999**, 33, 786-795.
- 58 K.D. Young, E.J. Leboeuf, *J. Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 4549-4553.
- 59 A.H. Rosas, L.C. Oliveira, T.C. Bellin, J.C. Rocha, L.P.C. Romao, N.L.D. Filho, *Thermochimica Acta.* **2005**, 433, 77-82.
- 60 E.A. Ghabbour, G. Davies, M.E. Goodwillie, K.O. Donaghy, T.L. Smith, *J. Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 3338-3342.
- 61 R.D. Vecchio, N.V. Blough, *J. Environ. Sci. Technol.* **2004**, 38, 3885-3891.
- 62 U.F.R. Zúñiga, D.M.B. Pereira Milori, W.T.L Da Silva, L.M. Neto, L.C. Oliveira, J.C. Rocha, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, 42, 1948-1953.
- 63 S. Nieto, *Tesis de Maestría*, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca Hgo; México, **2005**.
- 64 NOM-021-SEMARNAT-**2000**.
- 65 M. Amato, *Soil Biol. Biochem.* **1983**, 15, 611-612.
- 66 Y.P. Chin, G. Alken, E.O. Loughlin, *Environ. Sci. Technol.* **1994**, 28, 1853-1858.
- 67 F.J. Stevenson, *Humus Chemistry*, 2nd ed., Wiley/Inter-science, New York. **1992**, p. 213-217.
- 68 S. Fiol, R. López, A. Ramos, J.M. Antelo, F. Arce, *Anal. Chim. Acta*, **1999**, 385, 443-449.
- 69 J.D. Ritchie, E. M. Perdue, *Geochim. Cosmochim. Acta.* **2003**, 67, 85-96.
- 70 C. Plaza, J.C. García-Gil, A. Polo, N. Senesi, G. Brunetti, *J. of Environmental Quality.* **2005**, 34, 1131-1137.
- 71 M.M.S. Sierra, K. Arend, A.N. Fernández, M. Giovanela, B. Szpoganicz, *Anal. Chim. Acta.* **2001**, 444, 89-98.
- 72 J.S. Gaffney, N.A. Marley, S.B. Clark, *Humic and Fulvic Acids. ACS Symp. Ser.* **1996**, p. 96-107.
- 73 J. Kucerík, J. Kovár, M Pekar, *J. of Termal Análisis and Calorimetry.* **2004**, 76, 6242-6252.
- 74 K.D. Young, E.J. Leboeuf, *Environ. Sci. Technol.* **2000**, 34, 4549-4553.
- 75 S. Fisher, R. Kunin, *Analytical Chemistry.* **1955**, 27, 7, 1191-1194.
- 76 A.K. Pandey, S.D. Pandey, V. Misra, *Ecotoxicology and Environmental Safety.* **2000**, 47, 195-200.
- 77 C. Kolokassidou, I. Pashalidis, *Radiochim.* **2006**, 94, 9, 549-552.

- 78 S.J. Kalembasa, D.S. Jenkinson, *J. of the Science Food an Agriculture*. **1973**, 24, 1085-1090.
- 79 N. Fujitake, A. Kusumato, Y. Yanagi, T. Suzuki, H. Otsuka, *Soil Sci. Plant Nutr.* **2003**, 49(3), 347-353.
- 80 L.T. Shirshova, E.A. Ghabbour, G. Davies, *Geoderma*. **2006**, 133, 204-216.

Anexo

**Estudio de las interacciones ácido húmico-
metales pesados y determinación de sus
constantes de estabilidad por electroforesis
capilar**

Silvia Nieto-Velázquez, Lourdes Pacheco-Hernández, Carlos A. Galán-Vidal,
M. Elena Páez-Hernández

Revista Internacional "Información Tecnológica".

Effect of alkaline hydrolysis on the physicochemical humic acid properties

Silvia Nieto-Velázquez, Teresa De Jesús Liconá-Sánchez,
Giaan Arturo Álvarez-Romero, Carlos Andrés Galán-Vidal,
María Elena Páez-Hernández

Journal of Plant Nutrition and Soil Science