

EAP23. Estudio de la interacción de ácidos húmicos con Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+} y la determinación de sus constantes de equilibrio por electroforesis capilar.

Silvia Nieto Velázquez, María de Lourdes Pacheco Hernández*.

Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Centro de Investigaciones Químicas, Area de Química Analítica, Carretera Pachuca – Tulancingo Km. 4.5, C.P. 42076. Pachuca, Hidalgo, México.

E-mail: mpacheco@uaeh.reduaeh.mx

La materia orgánica encontrada en el suelo incluye una clase de compuestos conocidos como HUMUS o SUSTANCIAS HÚMICAS, las cuales son moléculas altamente funcionalizadas y ricas en carbón.

Los Ácidos Húmicos (AHs) son polímeros naturales altamente reactivos de los cuales aún no se conoce composición ni estructura. Por lo tanto, para conocer más detalladamente las fuentes de su capacidad intercambiadora, su efecto quelatante así como el tipo de interacciones llevadas a cabo entre los ácidos húmicos y algunos metales, se hace necesario el estudio analítico y sistemático de sus soluciones acuosas. En este sentido, el rápido avance e innovación de nuevas técnicas analíticas como la Electroforesis Capilar, ofrece varias ventajas sobre otras técnicas experimentales. En este trabajo se realizó el estudio de la interacción de un AH con algunos metales encontrados comunmente en el suelo, observando el comportamiento que existe entre el AH–Metal y posteriormente estimando el valor de las constantes de equilibrio correspondientes a partir de los electroferogramas experimentales. Se observó que las familias de electroferogramas van cambiando debido a la formación del (los) complejo(s) y que la afinidad del metal con el AH decrece en el siguiente orden: $\text{Cu(II)} > \text{Pb(II)} > \text{Hg(II)} > \text{Co(II)} > \text{Cd(II)}$.

1. Introducción

La materia orgánica encontrada en el suelo incluye una clase de compuestos conocidos como HUMUS o SUSTANCIAS HÚMICAS. La familia de las sustancias húmicas está formada por los ácidos húmicos, ácidos fúlvicos y huminas [1].

Los Ácidos Húmicos (AHs) son polímeros naturales altamente reactivos con propiedades múltiples y alta complejidad estructural ya que favorecen la formación de agregados, incrementan la disponibilidad y almacenaje de nutrientes en las plantas, son agentes quelatantes muy poderosos ya que pueden unirse a metales pesados [2-3], elementos radioactivos [4-5], pesticidas, herbicidas [6-7], etc., por lo tanto, pueden modificar la biodisponibilidad, transporte, fijación y toxicidad de los compuestos y/o elementos tóxicos (xenobióticos) en el ambiente.

Actualmente, los AHs están encontrando amplias aplicaciones en los campos de la industria [8-9], el medio ambiente [10-11] y farmacología [12-13], aunque su principal uso es en la agricultura [14-15], y es aquí donde influyen significativamente en la calidad y productividad de los suelos, ya que presentan una alta capacidad intercambiadora (transportan metales de un sitio a otro, como intercambiadores catiónicos débilmente ácidos), actúan como reguladores de pH (amortiguadores) y presentan una gran capacidad de retención de agua, lo cual es muy importante si se considera su posible uso en la remediación de suelos.

Los métodos electroforéticos hasta la fecha no han sido totalmente explotados con el propósito de estudiar a los AHs ni para poder entender su comportamiento y conocer o al menos describir mas precisa y detalladamente sus propiedades termodinámicas y fisicoquímicas. Por lo tanto, en este trabajo se realizó el estudio de la interacción del AH proveniente del carbón con algunos metales (Cu^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} , Co^{2+} y Cd^{2+}) y se estimó el valor de las constantes de equilibrio AH- Metal a partir de los resultados obtenidos por electroforesis capilar (movilidades electroforéticas obtenidas de los electroferogramas experimentales) y utilizando el programa computacional SQUAD [16].

2. Condiciones experimentales

2.1. Preparación de soluciones acuosas

2.1.1 Solución madre de AH

La solución madre del AH se preparó de la siguiente manera: se disolvieron 10 mg de AH sólido en 360 μl de NaOH 1 M y se aforó con agua desionizada hasta 10 ml (1000 ppm) [17]. Partiendo de esta solución se realizaron diluciones hasta llegar a una concentración de 100 ppm.

2.1.2 Solución de la sal del metal

Para la preparación de las soluciones de cada uno de los metales (Cu^{2+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+} y Co^{2+}) se utilizaron las correspondientes sales de nitrato a una concentración 0.01 y 0.001M. Cabe mencionar que todas las soluciones preparadas se pasaron a través de filtros millipore de 0.45 μm y se ultrasonificaron de 15 a 20 min con la finalidad de disolverlas completamente y eliminar burbujas para evitar bloqueos dentro del capilar y falsas señales.

2.2 Parámetros de electroforesis capilar

Los experimentos se realizaron utilizando capilar de sílice fundida, $L_{\text{Total}}=39$ cm, $L_{\text{Detector}}=28.5$ cm, d.i.= 50 μm , detector UV a 214 nm, inyector automático, buffer de ác. bórico 90mM / Tris 100 mM/ EDTA 1mM a pH = 8.5 y otro de acetatos 50 mM a valores de pH = 4.0 y 3.0. Polaridad normal y 20 kV como voltaje de separación.

2.3 Interacciones del AH con los diferentes metales

Para realizar el estudio de la interacción entre el AH y los metales y no perder información en cuanto al tipo de interacciones llevadas a cabo al entrar en contacto las especies químicas presentes, se realizaron dos tipos de experimentos diferentes para cada metal:

Experimento 1: a 1.5 mL de la solución del metal (0.001 M), se le adicionaron volúmenes conocidos de AH (1000 ppm) con el fin de estudiar desde una concentración muy pequeña hasta llegar a igualarse con la concentración del metal y sobrepasarla, con la finalidad de tener relaciones estequiométricas por arriba y por debajo de 1:1.

Experimento 2: a 1.5 mL de una solución de AH (100 ppm) se le adicionaron sucesivamente volúmenes de la solución del metal (0.01M) también con la finalidad de tener relaciones estequiométricas por arriba y por debajo de 1:1 (Figura 1).

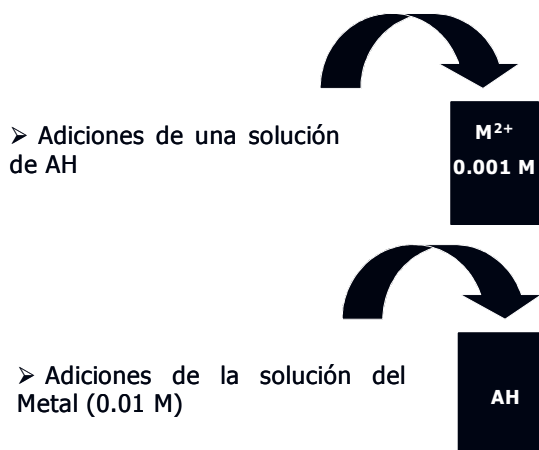


Figura 1. Experimentos realizados para estudiar las interacciones AH - Metal

2.4 Determinación de las constantes de equilibrio

Las movilidades efectivas experimentales ($\mu_{\text{eff}(\text{exp})}$) del metal (M) en presencia del ligando (L), de acuerdo a la siguiente reacción de complejación:



se obtuvieron de los electroferogramas experimentales y sustituyendo valores en la siguiente fórmula:

$$\mu_{eff(exp)} = \frac{L_{Tot} * L_{Det}}{V} (1/t_m - 1/t_{FEO})$$

$$\mu_{eff(exp)} = (\text{cm}^2 \text{ v}^{-1} \text{ s}^{-1})$$

Donde:

L_{Tot} = Longitud total del capilar

L_{Det} = Longitud del capilar hasta la ventana del detector

V = Voltaje aplicado para llevar a cabo la separación

t_m = Tiempo de migración del analito

t_{FEO} = Tiempo de migración del flujo electroosmótico (FEO)

Posteriormente, las constantes de equilibrio fueron estimadas utilizando el programa computacional SQUAD, el cual se basa en la minimización de la sumatoria de los residuales al cuadrado (mínima diferencia de las movilidades efectivas experimentales $\mu_{eff(exp)}$ y las movilidades efectivas calculadas $\mu_{eff(cal)}$ por el programa). Es decir, los valores de las constantes de equilibrio se obtuvieron cuando:

$$U = \sum (\mu_{eff(exp)} - \mu_{eff(cal)})^2 = \text{mínimo}$$

Cabe mencionar que debido a la complejidad estructural de las macromoléculas de AH, únicamente podemos considerar que los valores de las constantes de equilibrio obtenidas son estimaciones y de alguna manera promedio de varias interacciones, sin embargo, son muy útiles para tener un idea de la magnitud de las interacciones llevadas a cabo entre el AH y los metales bajo estudio.

3. Resultados y discusión

En el presente estudio se utilizó como base un AH muy puro (~1% de cenizas) conocido como Chemapex el cual proviene de minas de carbón (Chemapex Co., República Checa), además de que éste AH presenta una muy buena separación utilizando el buffer de ácido bórico/tris/EDTA (pH = 8.5) [17]. Sin embargo, debido a que el objetivo del presente estudio era el de seguir la interacción con ciertos metales, se observó que bajo estas condiciones de pH y debido a la presencia de agentes quelatantes del buffer (Tris y EDTA) en el sistema, no se podía seguir la complejación de los metales con el AH, ya que no se observa la señal del catión libre, debido a la formación de complejos estables con el EDTA y/o con el Tris. Por esta razón se decidió buscar otro tipo de buffer y otras condiciones de pH.

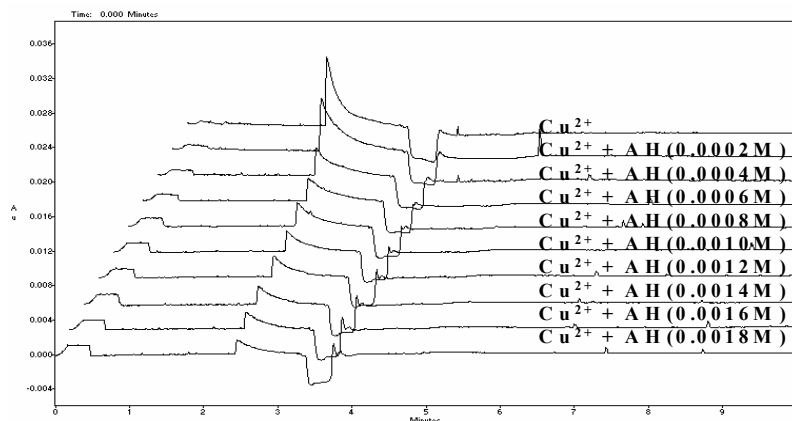
Obteniendo los diagramas distribución de especies para cada uno de los metales en estudio utilizando diferentes buffers (oxalato, citrato, fosfato, acetatos, entre otros), se pudo

observar que utilizando un buffer de acetatos a pH entre 3 y 4 únicamente se encuentran los iones del metal libre y algún complejo positivo los cuales pueden interaccionar con el AH. Los diagramas de distribución se calcularon para cada uno de los metales ya que se pretendía encontrar un buffer útil en todos los experimentos para su posterior comparación.

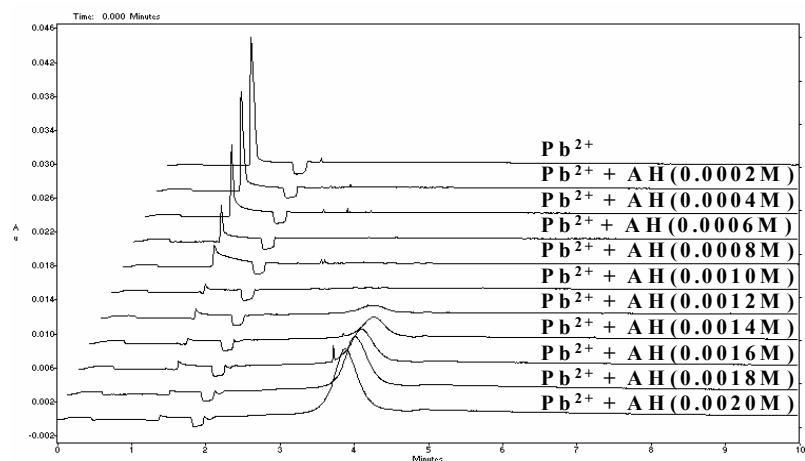
Inicialmente se llevaron a cabo los experimentos mencionados en el apartado 2.3 (Figura 1) utilizando el buffer de acetatos (50 mM, pH 4), los cuales consistieron en adiciones sucesivas de una solución de AH al metal (Figura 2). En la Figura 2(A) se observan los cambios en la intensidad de la señal del Cu^{2+} cuando se adicionaron diferentes concentraciones de AH. El desplazamiento de las señales hacia la derecha se deben a la reacciones de neutralización llevadas a cabo entre las macromoléculas de AH (negativas) y el Cu^{2+} (ion positivo). La formación de especies neutras se justifica porque la señal del Cu^{2+} se va acercando hacia el pico del marcador neutro (señal alrededor de 3.5 mins con intensidad negativa).

En la Figura 2(B) se observa un efecto similar ante las adiciones sucesivas del AH a una solución de Pb^{2+} , sin embargo, adicionalmente aparece la señal correspondiente al AH (alrededor de 4 mins) intensificándose debido al exceso de éste. Este hecho significa que la interacción AH- Pb^{2+} es menos intensa que la correspondiente a la del AH- Cu^{2+} ya que ante una misma concentración de AH en la solución, en un caso reacciona todo con el metal (Figura 2(A)), y en el otro el AH que queda sin reaccionar aparece su señal en el electroferograma (alrededor de 4 mins Figura 2(B)).

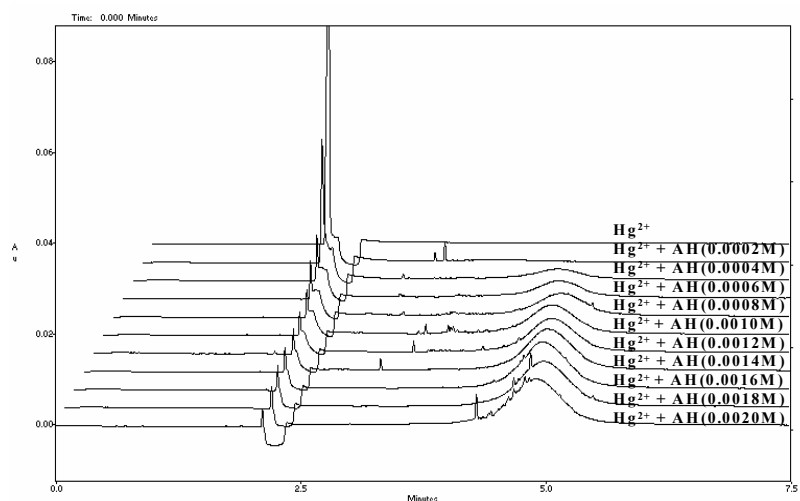
En el caso del Hg^{2+} (Figura 2(C)), la interacción con el AH parece ser tan débil que la señal correspondiente al AH libre aparece a valores de concentración muy bajos ($\sim 0.0004\text{M}$) por lo que su interacción con el metal es casi nula. Por otra parte, cabe mencionar que la señal correspondiente al Hg^{2+} (~ 2 min) nunca desaparece totalmente por lo que cierta cantidad permanece en la solución sin reaccionar. Se obtuvieron resultados similares para los experimentos con Cd^{2+} y Co^{2+} .



(A)



(B)



(C)

Figura 2. (A) Cu^{2+} - AH, (B) Pb^{2+} - AH y (C) Hg^{2+} - AH. Buffer de acetatos 50 mM a pH = 4.0, inyección hidrodinámica 5 seg, 3 psi de presión a 25 °C, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida, polaridad normal.

Por otra parte, los experimentos correspondientes a la adición de metal al AH, muestran efectivamente una fuerte relación con los resultados mostrados anteriormente. Cabe señalar también que éstos experimentos se llevaron a cabo utilizando el buffer de bórico-tris-EDTA, lo cual nos hacía dudar de la posibilidad de observar alguna interacción del metal con el AH por lo que los experimentos se realizaron adicionando el metal y agitando la mezcla antes de inyectarla para su posterior análisis por electroforesis capilar (Figura 1).

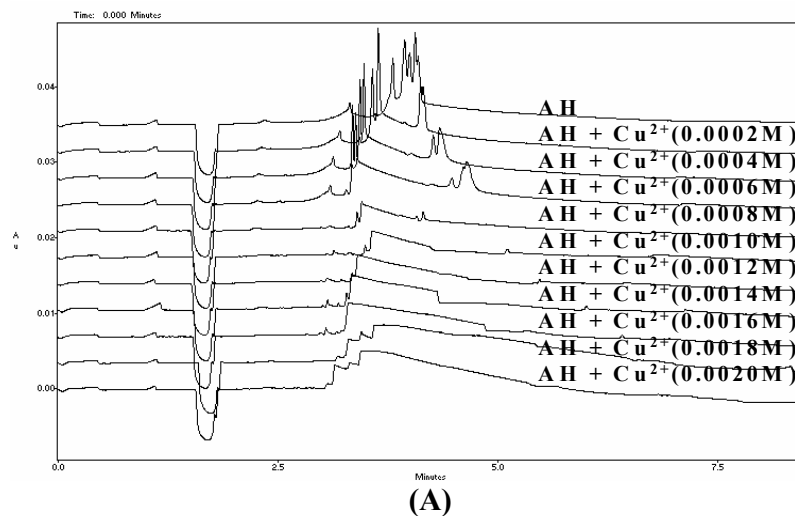
En la Figura 3(A) se muestran los electroferogramas correspondientes a la adición de Cu^{2+} en diferentes concentraciones a una solución de concentración constante de AH. El

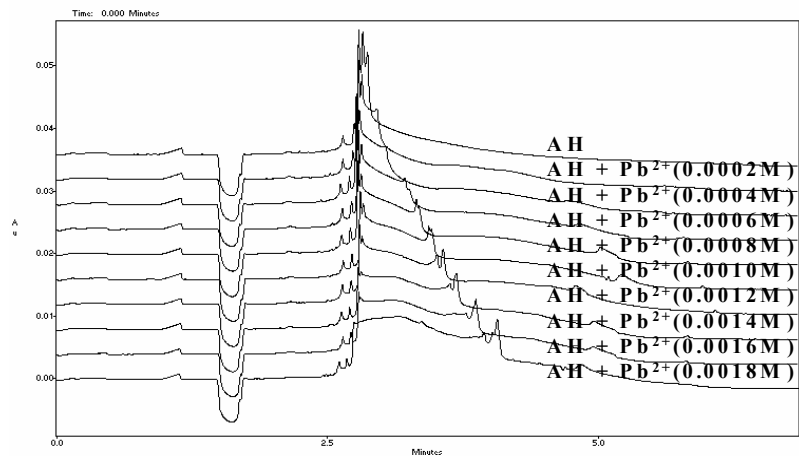
primer electroferograma del AH (arriba) se ve altamente modificado desde la primera adición de Cu^{2+} y continúa hasta la desaparición completa de las señales iniciales del AH. El resultado es una clara y fuerte interacción que no compite con el buffer pues las señales del AH desaparecen por completo. La única “curva” que se logra observar alrededor de 3 mins se atribuye al complejo AH-Cu^{2+} , la cual se considera una macromolécula de alto peso molecular con carga predominantemente negativa.

Por otra parte, la Figura 3(B) muestra los electroferogramas correspondientes a las adiciones sucesivas de Pb^{2+} al AH. En ésta figura se puede apreciar la aparición de nuevas señales de especies cargadas negativamente alrededor de 4 mins las cuales se pueden deber al “rompimiento” de la molécula de AH debido a la interacción con el metal y las que aparecen alrededor de 2.5 mins, igualmente, se deben quizá al “desprendimiento” de pequeñas fracciones cargadas positivamente. Sin embargo, en este caso se puede apreciar que el perfil del AH no se pierde, sino que simplemente se modifica haciéndose mas “ancho” lo que puede deberse a un reacomodo interno que modifica la disponibilidad de grupos funcionales en la superficie y por lo tanto pérdida en la intensidad y resolución de los picos.

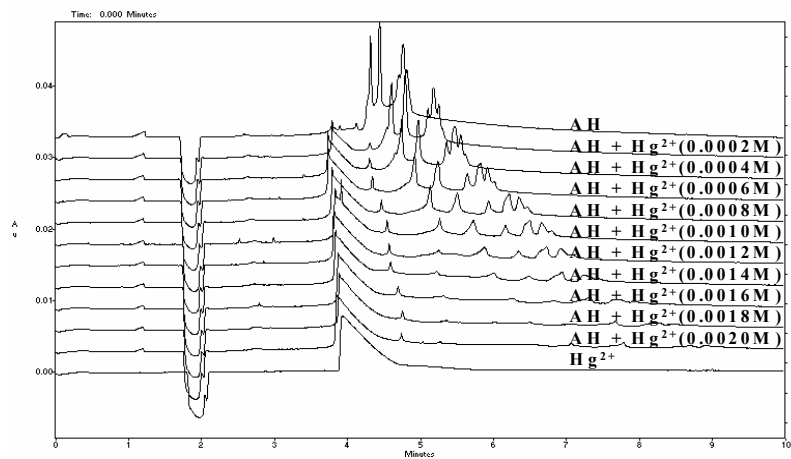
En cuanto a la adición de Hg^{2+} a la solución de AH (Figura 3(C)), se observó que desde la primera adición del metal apareció una pequeña señal correspondiente al complejo de Hg^{2+} quizá con EDTA (cargado negativamente) alrededor de 4 mins, ésto significa que la interacción AH-Hg^{2+} es tan débil que el metal prefiere unirse al EDTA presente en el buffer, exactamente al contrario de las adiciones de Cu^{2+} . En el caso del Co^{2+} se observó un comportamiento similar al mostrado cuando se realizaron las adiciones de Pb^{2+} (Figura 3(D)) descrito anteriormente.

Finalmente, respecto al Cd^{2+} (Figura 3(E)), es interesante observar que desde la primera adición del metal, el electroferograma del AH se modificó de tal manera que en las adiciones sucesivas se mantuvieron casi igual, lo que significa que la principal interacción AH-Cd^{2+} se llevó a cabo al inicio y después se mantuvo casi sin más reacción que la de neutralización, lo cual se refleja también en la disminución de la intensidad de las señales.

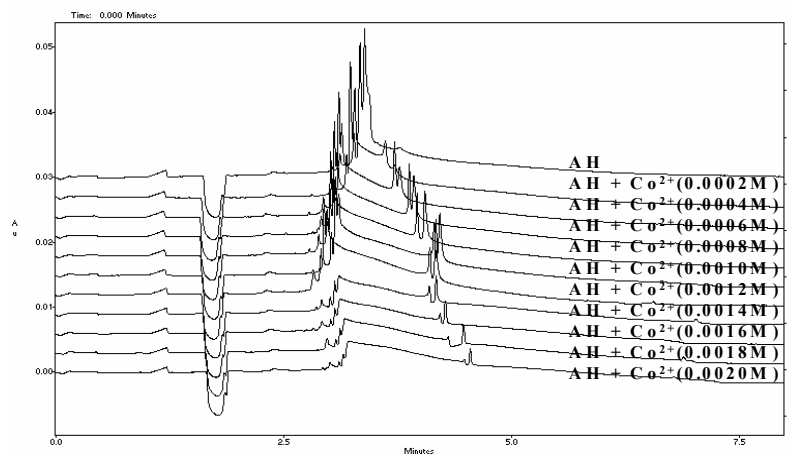




(B)



(C)



(D)

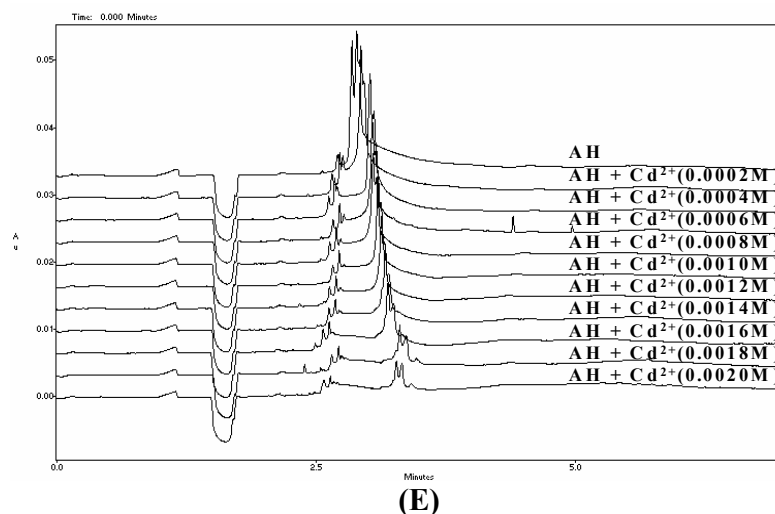


Figura 3. (A) AH - Cu^{2+} , (B) AH - Pb^{2+} , (C) AH - Hg^{2+} , (D) AH - Co^{2+} (E) AH - Cd^{2+} . Buffer: ác. bórico / tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 seg, 3 psi de presión a 25 °C, voltaje de separación 20 kV, capilar sílice fundida, polaridad normal.

3.1 Cálculo de las constantes de equilibrio AH-Metal

A partir de los electroferogramas experimentales (Figura 2) se procedió a calcular las movilidades efectivas experimentales ($\mu_{\text{eff}(\text{exp})}$) para cada uno de los metales y cada uno de los electroferogramas sustituyendo los valores correspondientes en la fórmula presentada en el apartado 2.4. En este caso el valor de t_m se consideró ser el tiempo del máximo del pico correspondiente al metal y t_{FEO} el tiempo del mínimo valor del pico invertido (~ 2.5 mins). Finalmente, se ordenaron los datos en una tabla para ser evaluados utilizando el programa computacional SQUAD hasta obtener valores con desviaciones mínimas, sin embargo, los valores obtenidos presentaron desviaciones muy grandes e inconsistentes por lo que se procedió a realizar los mismos cálculos de las movilidades electroforéticas experimentales a partir de los electroferogramas mostrados en la Figura 3 considerando t_m como el tiempo de migración del pico más alto del AH y t_{FEO} el tiempo del mínimo valor del pico invertido (~ 2 mins) y éstos datos se introdujeron en el programa computacional SQUAD nuevamente hasta obtener los valores estimados de las constantes de equilibrio con desviaciones mucho más pequeñas tal como se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores de las constantes de equilibrio del AH - Metal

Metal	Valores de constantes de equilibrio ($\log \beta_1$)
Cu (II)	3.62 ± 0.243
Pb (II)	3.48 ± 0.328

Hg (II)	3.18 ± 0.186
Co (II)	2.96 ± 0.199
Cd (II)	2.58 ± 0.327

En esta tabla se presentan los valores de las constantes de complejación obtenidas en el refinamiento y que presentaron las desviaciones mas pequeñas con un modelo químico 1:1, es decir, del complejo AH – metal en relación 1:1 ordenadas de valores mayores a menores, las cuales corresponden a las fuerzas de interacción decrecientes observadas en los electroferogramas de las Figuras 2 y 3.

4. Conclusiones

En el presente trabajo se pudo observar que en las familias de electroferogramas de las Figuras 2 y 3 las señales van cambiando debido a la formación del complejo AH-Metal, ya que existe una interacción de neutralización de carga entre el ión positivo del metal y la macromolécula negativa del AH, y siguiendo los resultados se observa que la afinidad del metal con el AH a valores de pH 4 y 8.5 decrece en el siguiente orden: Cu(II) > Pb(II) > Hg(II) > Co(II) > Cd(II), lo cual se pudo corroborar con los valores obtenidos de sus respectivas constantes de equilibrio. También es importante recalcar que gracias a estos estudios realizados se puede concluir que la interacción AH-Metal es diferente para cada uno de ellos y que la interacción del ión positivo con el AH es selectiva.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo económico parcial otorgado por PROMEP No. de Folio UAEHGO-PTC-202, a la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en especial al Centro de Investigaciones Químicas por su apoyo en el desarrollo del trabajo. Agradezco a la M.C. Ma Elena Páez Hernández por todo su apoyo durante la realización de los experimentos.

5. Referencias

1. F.J. Stevenson, Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reactions. Willey Interscience, New York, 1982.
2. P. Lubal, D. Siroky, D. Fetsch, J. Havel, Talanta, 47 (1998) 401.
3. D.N. Kurk, G.R. Choppin, Radiochimica Acta, 88, 9 - 11 (2000) 583.
4. P. Lubal, D. Fetsch, D. Siroky, M. Lubalová, J. Senkyr, J. Havel, Talanta, 51 (2000) 977.

5. M.L. Pacheco, J. Havel, *Radioanal. Nucl. Chem.*, 248 (2001) 565.
6. B. Gevao, K.T. Semple, K.C. Jones, *Environ. Pollution*, 108 (2000) 3.
7. F. Fang, S. Kanan, H.H. Patterson, *Anal. Chim Acta*, 373 (1998) 139.
8. R. Lapasin, E. Lucchini, *Informazione*, 17 (1982) 468.
9. E.F. Majakova, V.A. Proskurjakov, *Proceedings of 4th International Peat Congress. Ontaniemi, Finland (1972)* 235.
10. P. McCarthy, *Aquatic Humic Substances*, American Chemical Society, USA, 1989.
11. V. Samanidou, I. Papadoyannis, G. Vasilikiotis, *J. Environ. Sci. Health*, 26 (1991) 1055.
12. E. Yamada, T. Ozaki, M. Kimura, *Analytical Sciences*, 14 (1998) 327.
13. W. Pflug, W. Ziechman, *Soil Biol. Biochem.*, 14 (1982) 165.
14. D. Augustyn, H. Martyniuk, H. Dzik, H. Urbaniak, *Chemical Abstracts*, 95 (1980) 41.
15. Z. Sladký, V. Tichý, *Biologia Plantarum*, 1 (1959) 9.
16. D.J. Legget, W.A. McBryde, *Anal. Chem.*, 47 (1975) 1065.
17. M.L. Pacheco H., *Tesis de Doctorado, Brno, República Checa, 2002.*