

IMPLEMENTACIÓN Y EVALUACIÓN DE LA METODOLOGÍA PARA LA INTERACCIÓN DE ÁCIDOS HÚMICOS EN PRESENCIA DE ARSÉNICO POR ELECTROFORESIS CAPILAR DE ZONA

S. Nieto-Velázquez^{1,*}, D. Saldaña-Ramírez¹, M. E. Páez-Hernández¹

¹Área Académica de Química, UAEH, Mineral de la Reforma, Hidalgo

* Autor de correspondencia: nieto@uaeh.edu.mx

RESUMEN

Los ácidos húmicos (AHs) se consideran los componentes principales de la materia orgánica del suelo, agua y sedimentos, son insolubles en medio acuoso bajo condiciones ácidas ($\text{pH} < 2$) pero son solubles a valores de pH mayores; tienen carga negativa y su color en solución es café. Todas las características que se acaban de mencionar se deben principalmente a los grupos carboxílicos e hidróxidos ($-\text{COOH}$ y $-\text{OH}$) que poseen en su estructura. Es por ello que pueden interactuar con todo tipo de iones metálicos, no metálicos, agroquímicos, elementos radioactivos, entre otros. Modificando la transferencia, fijación o biodisponibilidad de los iones en sistemas ambientales.

En este trabajo de investigación se reporta la metodología desarrollada en un equipo de electroforesis capilar de zona para analizar de forma más detallada la interacción de los AHs en presencia de arsénico (As), metaloide altamente tóxico. No obstante, realizando los diferentes experimentos se obtuvieron las siguientes condiciones de separación: tiempo de inyección: 5 s (hidrodinámica), presión de inyección: 2 psi, temperatura de separación: 25°C , voltaje aplicado: 20 kV y tipo de capilar: sílice fundida con polaridad normal ($L_t = 34.8$ cm, $L_d = 25.43$ cm, d.i. = $50 \mu\text{m}$). En la separación se utilizó un buffer ác. bórico / Tris / EDTA $\text{pH} = 8.5$. Bajo estas condiciones se pudo demostrar la interacción de los AHs con el As más específicamente con el orto-arsenito, sal del ácido ortoarsenioso (H_2AsO_3^-) observando las modificaciones que presentan los electroferogramas. No obstante, obteniendo como resultado la formación de complejos (interacciones entre el ión con la macromolécula del húmico) y repercutiendo en la importancia de la movilidad del As en sistemas como suelo y/o agua.

Palabras Clave: Ácidos Húmicos, Arsénico, Interacción, Parámetros Electroforéticos, Electroforesis Capilar de Zona.

1. INTRODUCCIÓN

El suelo es un sistema vivo y dinámico, heterogéneo en su estructura y funciones biológicas, aunque homogéneo en su equilibrio [1]. En muchos lugares el suelo es el principal recurso natural del que dependen la agricultura, la ganadería y, por tanto, la alimentación. El concepto calidad del suelo está relacionado con diferentes funciones (producción de biomasa, regulación ambiental, reciclaje de materias primas, hábitat para organismos, reserva genética, sustento físico para la actividad, entre otros) que pueden definirse como la capacidad del suelo para funcionar dentro de los límites de su ecosistema, con el fin de mantener la productividad biológica, calidad ambiental y promover la salud de los seres vivos [2].

Los suelos son sistemas complejos formados principalmente por materia inorgánica y materia orgánica (MO), así como organismos que en él viven (biomasa animal y vegetal), agua y gases. La principal composición de la MO son moléculas pequeñas (aminoácidos, carbohidratos, proteínas, péptidos,

lípidos, ácidos orgánicos de bajo peso molecular, entre otros) y las sustancias húmicas (SHs), también conocidas con el nombre de humus [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].

Sin embargo, como ya se mencionó los AHs son los componentes principales y más abundantes de la MO, no obstante, debido a su gran cantidad y variedad de grupos funcionales que poseen en su macromolécula sobre todo grupos carboxílicos e hidróxidos (-COOH y -OH) pueden interactuar principalmente con cationes por el carácter ácido que presentan, sin embargo, estos AHs pueden reaccionar con todo tipo de iones. Es por ello que en este trabajo de investigación nos enfocamos a desarrollar una metodología sencilla, fácil de manipular y económica por electroforesis capilar (EC) para el análisis de los AHs y como interactúan con As, siendo un metaloide altamente tóxico. A partir de este análisis podemos simular el comportamiento del metaloide en sistemas ambientales como suelo y agua [6-7], modificando concentraciones (0.15 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm) y el pH (4 y 8.5), así como se presenta en múltiples factores edáficos que afectan su disponibilidad, tanto para plantas como para organismos: parámetros químicos (pH, Eh, en presencia de: óxidos de Fe, fósforo, materia orgánica, entre otros), físicos (compactación, porosidad, textura, color, entre otros), ambientales (clima, relieve, altitud, topografía, entre otros) y biológicos (cambios en la especiación). Todos estos factores van a condicionar el dinamismo y la complejidad del ciclo biogeoquímico del As [2].

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Los experimentos se realizaron en un equipo Beckman MDQ, equipado con un sistema de detector UV/Vis a una longitud de onda (λ) de 214 nm e inyector automático.

Para el estudio por EC se utilizó un ácido húmico comercial CHEMAPEX (AH-CH) obtenido del carbón y debido a su alta pureza (11.7 % de cenizas) se trajo para desarrollar inicialmente todo el método electroforético [8-9], posteriormente se analizaron tres AHs extraídos de suelos de Atotonilco (AH-A), Tulancingo (AH-T) y Chapantongo (AH-C) del estado de Hidalgo. El buffer que se utilizó para el desarrollo de la metodología y separación fue de ác. bórico / Tris / EDTA a pH= 8.5 [10-11]. Adicionalmente, también se utilizará un buffer de acetatos a pH de 4.0 para el estudio de la interacción de los AHs con As [12].

Preparación de Soluciones:

- a). **Solución madre de AH (1000 ppm):** se disolvieron 10 mg de AH sólido en 360 μ L de NaOH 1.0 M y se aforó con agua desionizada a 10 mL [11].
- b). **Solución del trióxido de arsénico:** para la preparación de las diluciones de As (0.15 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm), se utilizó una solución de As₂O₃ a una concentración 0.001M (1.0 mM) y se aforó con agua desionizada a 50 mL.
- c). **Solución buffer:** Preparado con 9×10^{-2} M de ác. bórico + 11.5×10^{-2} M Tris + 7.5×10^{-4} M EDTA a pH = 8.5.

Cabe mencionar que todas las soluciones preparadas se pasaron a través de filtros Millipore de 0.45 μ m y se ultrasonificaron por 10 min con la finalidad de eliminar burbujas y evitar bloqueos dentro del capilar y falsas señales.

2.1. Desarrollo del método de separación por EC

Se utilizó un capilar de sílice fundida (capilar negativo), con las siguientes medidas: L_t = 34.8 cm, L_d = 25.43 cm, d.i.= 50 μ m, antes de iniciar con el desarrollo del método se acondicionó el capilar con

NaOH 0.1 y 1 N, con H₂O y buffer (ác. bórico / Tris / EDTA) a una temperatura de 25°C, voltaje de 20 kV y con diferentes tiempos, con la finalidad de activar los grupos silanol (Si-OH) del capilar.

El parámetro que se modificó inicialmente fue el tiempo de inyección dejando constante la presión, temperatura y voltaje (3 psi, 25°C y 20 kV) de separación de la muestra de AH-CH (100 ppm), posteriormente se fueron modificando cada uno de los parámetros, tal y como se presenta en la tabla 1. Con la finalidad de encontrar las condiciones adecuadas y reproducibles en la separación e interacción de los AHs por EC.

Tabla 1. Parámetros físicos utilizados en el desarrollo del método electroforético.

Tiempo de inyección (s)	Presión (psi)	Temperatura (°C)	Voltaje (kV)
Modificación del tiempo			
5	3	25	20
7	3	25	20
10	3	25	20
15	3	25	20
Modificación de la presión			
5	0.5	25	20
5	1	25	20
5	1.5	25	20
5	2	25	20
5	2.5	25	20
5	3	25	20
5	4	25	20
5	5	25	20
Modificación de la temperatura			
5	2	15	20
5	2	20	20
5	2	25	20
5	2	30	20
5	2	35	20
5	2	40	20
Modificación del voltaje			
5	2	25	10
5	2	25	15
5	2	25	20
5	2	25	25
5	2	25	30

2.2. Interacción de los AHs con As por EC

Como se mencionó en el apartado anterior, se desarrolló un método por EC reproducible, el cual nos permitió comparar a los AHs extraídos de diferentes suelos (AH-A, AH-T y AH-C) y un AH comercial (AH-CH); para ello se evaluó el tiempo de inyección, presión de inyección, temperatura de separación, voltaje de separación y concentración con la finalidad de lograr mejores separaciones de las muestras y con este mismo método se logró analizar a los AHs en presencia de As, como a continuación se describe:

Experimento 1: en un matraz volumétrico de 10 mL se adicionó 1.0 mL de la solución madre de AH de 1000 ppm y se aforó. Se realizó el mismo procedimiento con los cuatro AHs (AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C).

Experimento 2: en tres matraces volumétricos de 10 mL se adicionó a cada uno 1.0 mL de la solución madre de AH de 1000 ppm, posteriormente se adicionó al primer matraz 10 μ L, al segundo 33.5 μ L y 67 μ L al tercero de la solución de As₂O₃ 0.1 mM y se aforaron, logrando obtener concentraciones de 0.15 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm de As. Se realizó el mismo procedimiento con los cuatro AHs (AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C).

Todos los experimentos se realizaron por triplicado por EC con el método desarrollado en el apartado anterior, con la finalidad de observar los cambios en los electroferogramas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Desarrollo del método de separación por EC

En el desarrollo del método se comenzó con la variación del tiempo de inyección y con la presión de inyección de muestra, ya que, al realizar algunas pruebas preliminares, se observó que ambos parámetros son los que influyen significativamente en la separación y resolución de las señales de la muestra.

En la figura 1 se presentan los electroferogramas del AH-CH a 5, 7 y 10 s de tiempos de inyección. Como se puede observar el tiempo de inyección adecuado es a 5 s, a tiempos de inyección menores las señales mostraron intensidades muy pequeñas y con muy poca resolución. Sin embargo, a tiempos mayores de 5 s toda la macromolécula de AH migra sin separarse, observándose una sola señal con gran intensidad.

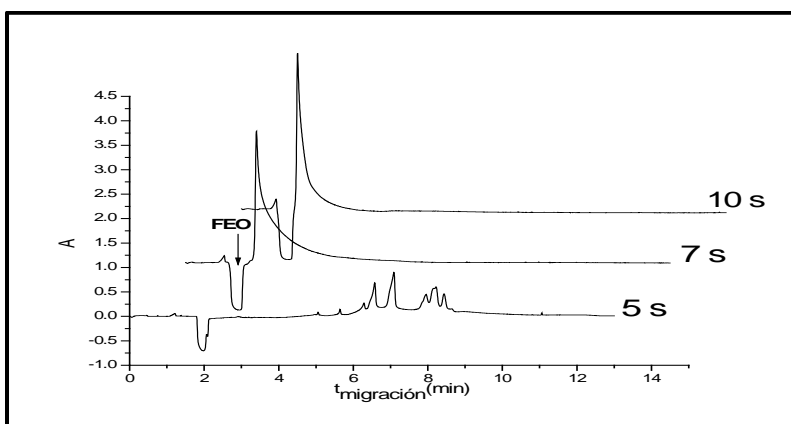


Figura 1. Electroferogramas AH-CH. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica a 5, 7 y 10 s, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

En la figura 2 se muestran los electroferogramas a diferentes presiones de inyección (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 psi), observando que a 2 psi se obtiene una mejor separación y resolución de las señales en comparación con los electroferogramas de 2.5 y 3 psi. Con la presión 1.5 psi se observa una mejor separación, aunque tampoco están completamente resueltos los picos, la intensidad de la señal disminuye y el tiempo de análisis se incrementa. Por lo tanto, a mayor presión observamos una menor separación, mayor intensidad y las señales se obtienen más definidas. Esto quiere decir que entre mayor sea el tiempo y la presión de inyección habrá una menor separación de la muestra esto se debe a que el capilar se satura y no se lleva a cabo una adecuada separación.

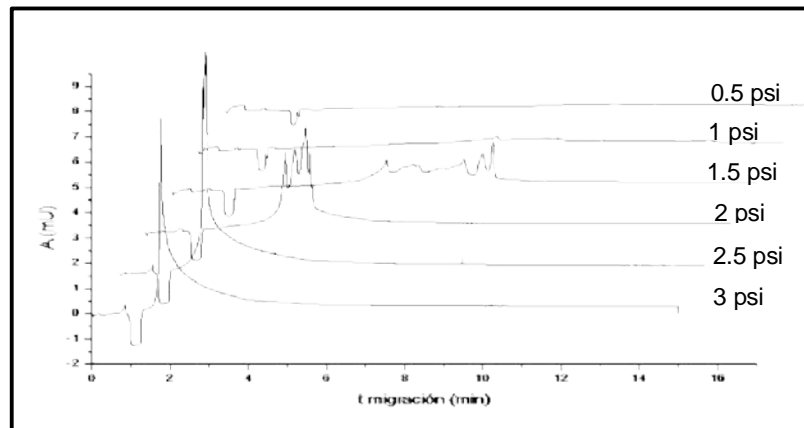


Figura 2. Electroferogramas AH-CH. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 s, presión de inyección 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 y 3 psi, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

En la figura 3 y 4 se muestran los electroferogramas a diferentes temperaturas (15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C) y voltajes de separación (10, 15, 20, 25 y 30 kV). En los electroferogramas de la variación de temperatura (figura 3) se puede observar como al ir aumentando este parámetro la separación de la muestra es menor, esto se debe a que la muestra tiende a ser menos viscosa dentro del capilar y el AH se aglutina o polimeriza más fácilmente, por lo que la temperatura adecuada es de 25 °C.

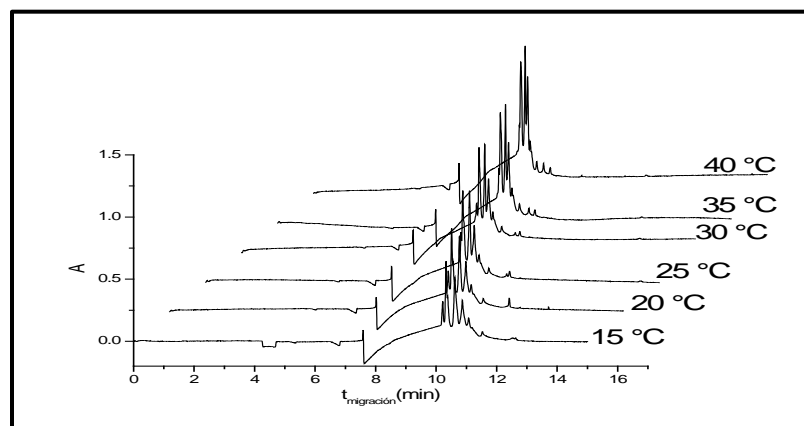


Figura 3. Electroferogramas AH-CH. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 s, presión de inyección 2 psi, a 15, 20, 25, 30, 35 y 40 °C, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

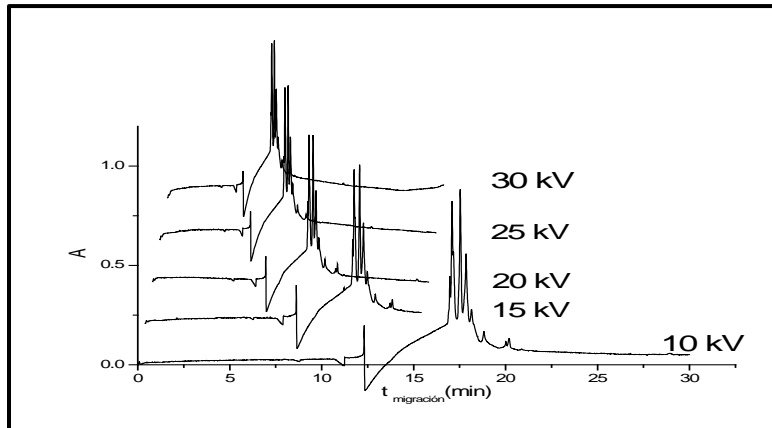


Figura 4. Electroferogramas AH-CH. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 s, presión de inyección 2 psi, a 25 °C, voltaje de separación a 10, 15, 20, 25 y 30 kV, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

Por otro lado, en los electroferogramas de la figura 4 se observa una menor separación de la muestra al aplicar una mayor cantidad de voltaje, no obstante, se decidió por el valor adecuado de 20 kV. Con base a los electroferogramas obtenidos y analizados (figuras 3 y 4), nuevamente se corroboró que a diferentes temperaturas y voltajes se obtienen resultados muy parecidos no muy modificados comparados con la gran variación que presentan los electroferogramas con el cambio de tiempo y presión de inyección o al menos no se observaron cambios muy relevantes en la modificación.

Finalmente, se llegaron a las condiciones óptimas de separación de los AHs, las cuales son: tiempo de inyección: 5 s (hidrodinámica), presión de inyección: 2 psi, temperatura de separación: 25°C voltaje aplicado: 20 kV y tipo de capilar: sílice fundida con polaridad normal.

3.2. Interacción de los AHs con As por EC

Con el método desarrollado por EC nos permitió analizar y comparar a los AHs (AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C) extraídos del estado de Hidalgo y el AH comercial, así como evaluar su interacción con As.

En las figuras 5 y 6 se presentan los electroferogramas con las condiciones adecuadas, como se puede observar los electroferogramas de los AH-CH, AH-A y AH-T son muy parecidos y reproducibles, con intensidades mayores comparadas con el AH-C que presenta señales con intensidades muy bajas y con una menor resolución, pero más definidas en lo que respecta a la separación y con un desplazamiento en el tiempo de migración.

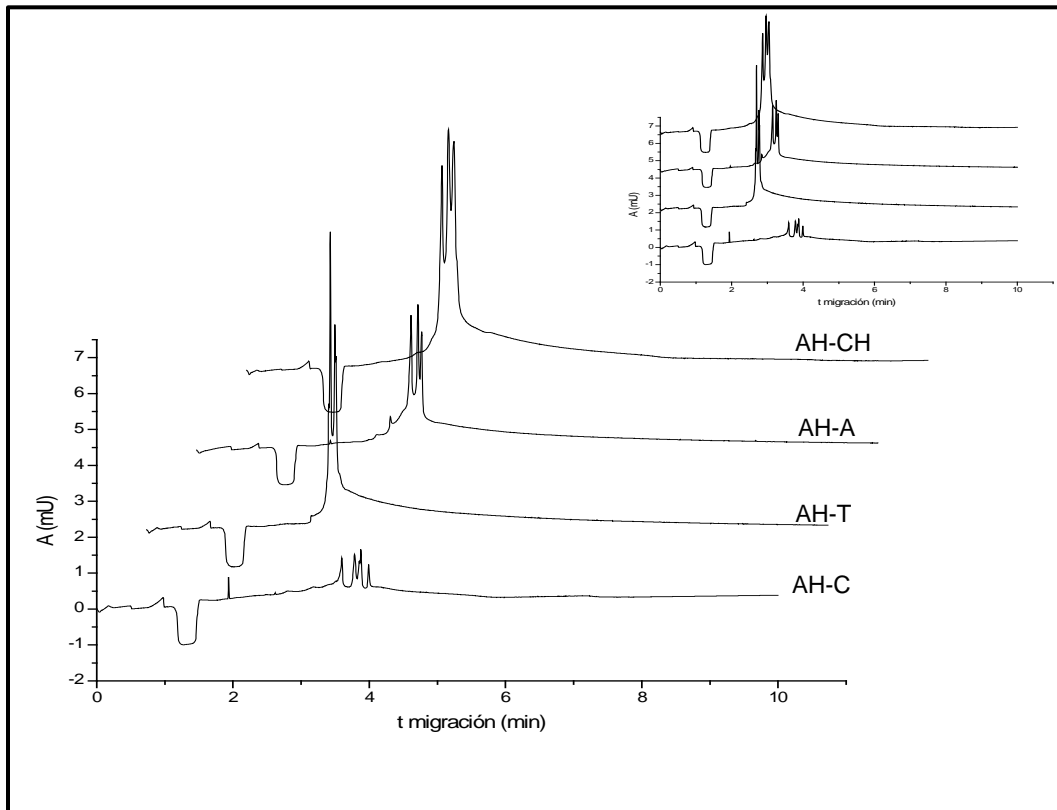


Figura 5. Electroferogramas AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 s, presión de inyección 2 psi, a 25 °C, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

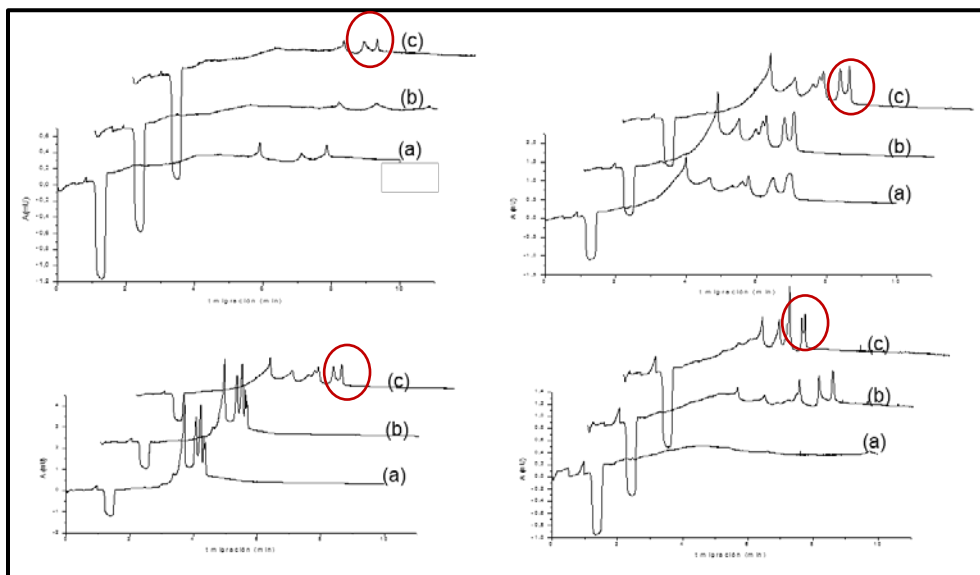


Figura 6. Electroferogramas AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C con AS (a) 0.15 ppm, (b) 0.5 ppm y (c) 1.0 ppm. Buffer ác. bórico / Tris / EDTA a pH = 8.5, inyección hidrodinámica 5 s, presión de inyección 2 psi, a 25 °C, voltaje de separación 20 kV, capilar de sílice fundida y polaridad normal.

En las familias de electroferogramas (figura 6) se van modificando las señales respecto a su intensidad y separación, así como el tiempo de migración con respecto a las diferentes concentraciones de As (0.15 ppm, 0.5 ppm y 1.0 ppm). No obstante, se observaron dos señales características aproximadamente en el tiempo de migración de 8 min en los cuatro electroferogramas de los AHs (AH-CH, AH-A, AH-T y AH-C) y con la concentración 1.0 ppm de As, más específicamente con el H_2AsO_3^- (orto-arsenito, sal del ácido ortoarsenioso) a las condiciones del pH = 8.5. Obteniendo como resultado la formación de complejos (interacciones entre el ión con la macromolécula del húmico).

4. CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado (evaluando diferentes condiciones) para el desarrollo e implementación de un método de análisis de los AHs e interacción con As por EC, se concluye con las condiciones adecuadas de trabajo, obteniendo electroferogramas muy aceptables comparados con la literatura.

Con el análisis realizado por EC se observó que la interacción del As es diferente en cada uno de los AHs (extraídos en el laboratorio y un AH comercial) y selectiva. Se pudo corroborar con los electroferogramas.

Se concluye con una nueva metodología adecuada y reproducible para el posterior cálculo de las constantes de equilibrio: AH-As por EC, la cual una técnica muy rápida, fácil de manipular y económica.

AGRADECIMIENTOS

Silvia Nieto Velázquez agradece el financiamiento PROMEP con no. de oficio de liberación: DSA/103.5/14/10566.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] M.C. Lobo: Procesos de degradación del suelo, 1ra ed., CIEMAT. Madrid, España, 2007, pp. 27-36.
- [2] E. Moreno-Jiménez, J.M. Peñalosa, R. Manzano, R.O. Carpena-Ruiz, R. Gamarra y E. Esteban: Hazardous Materials, 2009, vol. 162, pp. 854-859.
- [3] M.M. kononova: Materia orgánica del suelo, 1ra ed., Oikos-tau. Barcelona, España, 1982, pp. 63-105.
- [4] G. Davies, E.A. Ghabbour and C. Steelink: Chemical Education, 2001, vol. 78, No. 12, pp.1609-1614.
- [5] R.S. Swift: Organic matter characterization. (chap 35), chemical methods, 1996, pp. 1018-1020. Consultado el 25 de noviembre del 2014 en www.humicsubstances.org/soilhafa.html.
- [6] E.D. Burton, S.G. Johnston and B. Planer-Friedrich: Chemical Geology, 2013, vol. 343, pp.12-24.
- [7] F. Hoda and L. Tsair-Fuh: Hazardous Materials, 2014, vol. 279, pp. 569-578.
- [8] P.h. Schmitt-Kopplina, A.W. Garrisonb, E.M. Perducc, D. Freitag and A. Ketrupa: Chromatography A, 1998, vol. 807, pp. 101-109.
- [9] F. d'Orlyé and P.E. Reiller: Colloid and Interface Science, 2012, vol. 368, No. 1, pp. 231-240.
- [10] D. Fetsch and J. Havel: Chromatography A, 1998, vol. 802, No. 1, pp. 189-202.
- [11] M.L. Pacheco: Tesis de Doctorado. Facultad de Ciencias, Universidad de Masaryk, República Checa, 2002.
- [12] S. Nieto-Velázquez: Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Pachuca Hgo; México, 2005.