

Evaluación fluorométrica de los ácidos húmicos y su interacción con cationes Fluorometric evaluation of the humic acids and its interact with cations

K. F. Martínez-Martínez ^a, O. J. Hernández-Ortiz ^b, R. A. Vázquez-García ^b, S. Nieto-Velázquez ^{a*}

^aÁrea Académica de Química, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

^bÁrea Académica de Ciencias de la Tierra y Materiales, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 42184, Mineral de la Reforma, Hidalgo, México.

Resumen

Los ácidos húmicos (AHs) presentan una naturaleza multicromofórica y compleja, comportándose como polímeros condensados y humificados, que se relacionan con el grado de acidez y con la cantidad de grupos carboxílicos (-COOH) principalmente, el AH-A (Atotonilco, Hidalgo) es el que contiene una mayor cantidad de estos grupos, no obstante, respecto al cociente $E_4/E_6 < 5$ se relaciona con AHs humificados, todos muestran un valor por debajo de 5 a excepción del AH-Hu (Huasca, Hidalgo), que presenta un ligero incremento y se debe a posibles cadenas alifáticas. En relación a los bajos valores en sus rendimientos cuánticos (ϕ_{AH}), indican su complejidad estructural y sus propiedades ópticas que surge de la absorción y emisión continua, desde estados de transferencia de carga intramoleculares formados por grupos donores y aceptores oxidados. Los AHs se comportan como polímeros orgánicos que ayudan ampliamente en los procesos naturales (suelo y agua) y artificiales (posibles materiales ópticos) al interactuar con cationes (AH-Al > AH-Fe > AH-Ca > AH-Mg).

Palabras Clave: Ácido, Húmico, Metal, Interacción, Fluorescencia.

Abstract

The humic acids (HAs) have a multichromophoric and complex nature, behaving as condensed and humified polymers related to the degree of acidity and the amount of carboxylic groups (-COOH) principally, presenting a greater number of these groups the HA-A (Atotonilco, Hidalgo), however, the ratio $E_4/E_6 < 5$, this is related to humified HAs, all show a lower value, with the exception of HA-Hu (Huasca, Hidalgo), which present a slight increase related to possible aliphatic chains. In relation to the low values of their quantum yields (ϕ_{AH}), they indicate their structural complexity and their optical properties that arise from continuous absorption and emission, from intramolecular charge transfer states formed by donor groups and oxidized acceptors. The HAs behave like an organic polymer that widely helps in natural (soil and water) and artificial (possible optical materials) processes by interacting with cations (HA-Al > HA-Fe > HA-Ca > HA-Mg).

Keywords: Acid, Humid, Metal, Interaction, Fluorescence.

1. Introducción

Las sustancias húmicas (SHs) están presentes en la materia orgánica del suelo, agua o sedimentos, constituidas por una mezcla de moléculas complejas, cuyo origen se debe a la descomposición y oxidación de la biomasa vegetal y animal a través del proceso llamado humificación. La fuente principal de las SHs por lo general proviene de la transformación de la lignina de las plantas, de los polifenoles de las células y de síntesis microbiana, que contiene ácidos orgánicos de alto peso

molecular y relativamente pocos grupos funcionales (Stevenson, 1992). Estas sustancias se caracterizan por poseer una estructura extremadamente compleja, no definida, no similar y de elevado peso molecular, debido a que dependen de propiedades fisicoquímicas de cada sitio o lugar (clima, condiciones atmosféricas, vegetación, régimen de lluvia, hidrología, variables del suelo como la aireación, pH, temperatura, evapotranspiración, saturación de sales, presencia de metales activos y de carbonatos, contenido de arcillas, entre otros).

*Autor para la correspondencia: nieto@uaeh.edu.mx

Correo electrónico: nieto@uaeh.edu.mx (Silvia Nieto-Velázquez), ma415571@uaeh.edu.mx (Kevin Fabian Martínez-Martínez), javier_hernandez@uaeh.edu.mx (Óscar Javier Hernández-Ortiz), rosavg@uaeh.edu.mx (Rosa Ángeles Vázquez-García).

No obstante, debido a la complejidad estructural de las moléculas, su arreglo geométrico variable y alta polimerización, la cantidad y variedad de compuestos y grupos funcionales que la conforman, son las SHs muy importantes e interesantes de analizar, es por ello, que surge la Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (por sus siglas en inglés IHSS), es una organización cuyo objetivo es la educación científica, la investigación y la comprensión pública de estas sustancias, con base a las investigaciones de muchos años.

Las SHs se encuentran clasificadas en función de la solubilidad que presentan en relación al pH, es decir, cuando se tratan con álcali (NaOH) y medio ácido (HCl), las huminas no son solubles, los ácidos fúlvicos son solubles en todo el intervalo de pH y los ácidos húmicos son solubles a un $\text{pH} > 2$ (Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas, 2023). Sin embargo, estructuralmente se ha determinado que los ácidos húmicos difieren de los ácidos fúlvicos, en que se encuentran más condensados (protón intercambiable de los ácidos carboxílicos), con mayor tamaño molecular, aunque presentan una menor cantidad de grupos funcionales oxigenados y poseen un predominio de núcleos aromáticos que derivan de fenoles, quinonas, ácidos benzoicos, benzocarboxílicos y ácidos furánicos (esqueleto de naturaleza aromática) y menor cantidad de cadenas alifáticas, aumentando la estabilidad de los AHs y presentan mayor grado de humificación (ácidos viejos), debido a su alto grado de oxidación (Figura 1). La cantidad de carbono e hidrógeno es mayor en los AHs comparado con la cantidad de oxígeno lo que hace que presenten una menor movilidad como consecuencia de su tamaño molecular, no obstante, la proporción entre grupos hidrófobos (compuestos cíclicos y aromáticos) y grupos hidrófilos (radicales laterales y cadenas alifáticas) caracterizan su comportamiento en cuanto a la solubilidad y destacan por su enorme capacidad de intercambio catiónico (CIC) (Camargo y Cruz, 1999).

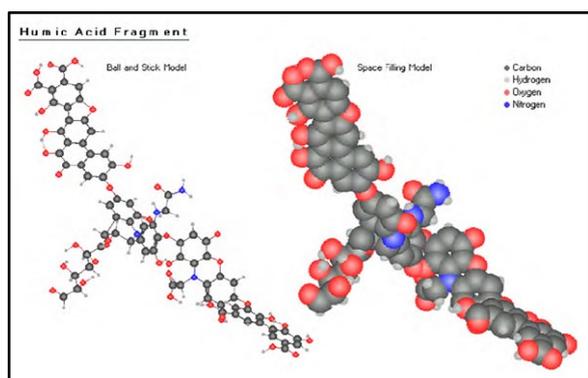


Figura 1: Fragmento de ácido húmico (Humintech GmbH, 2023).

Los AHs mejoran en gran medida la CIC, por lo que la disponibilidad de cationes aumenta, lo que les otorga características de agentes quelantes débiles, permitiendo la formación de estructuras cíclicas con los cationes metálicos, sin duda esta es una de sus características más importante su capacidad para unir iones, óxidos e hidróxidos metálicos insolubles, y liberarlos lenta y continuamente a los vegetales

cuando sea necesario, lo que genera beneficios físicos, químicos y biológicos (Cerisola, 2015). Estos ácidos tienen la facilidad de formar complejos con distintos metales cuando se encuentran a un determinado pH.

Una vez que los AHs se han complejoado, es posible describir una constante de formación global y una constante de equilibrio a cierto pH, de esta manera, se puede obtener la concentración del ligante unido y la concentración restante del metal libre que no se complejoó. Los métodos químicos basados en titulaciones ácido-base indican la presencia de grupos carboxílicos, fenólicos, hidroxílicos, alcohólicos y quinoides generados por los procesos de humificación como parte final de la degradación orgánica de moléculas de gran peso molecular. Si se conocen las concentraciones de las especies metálicas ligadas y libres en cualquier punto de la titulación ácido-base, se puede representar al AHs como un conjunto de ácidos monopróticos en relación a los grupos carboxílicos con valores de pKa determinados, cuyos aniones serán los encargados de la formación de complejos (Plaza *et al.*, 2006).

Al evaluar soluciones alcalinas de los AHs y modificar el $\text{pH} \approx 4$ y 5 (Almendros, 2008), se presentan cargas negativas por la desprotonación de los ácidos carboxílicos (-COOH) principalmente, impidiendo la formación de agregados o aglomerados y permaneciendo en un medio no estable (Gomes *et al.*, 2016), para que estas impurezas solubles puedan ser removidas es preciso alterar algunas características del medio natural (suelo o agua). No obstante, en la actualidad el estudio de los AHs ha estado en aumento de manera sorprendente, debido a que su uso favorece enormemente en los diferentes procesos, métodos o técnicas, sobre todo agrícolas, sin embargo, se evalúan a estos ácidos en los procesos de tratamiento de agua para dar calidad, desde el color (turbiedad) hasta la eliminación de contaminantes por medio de la floculación, precipitación y filtración, contribuyendo los AHs como un polielectrolito (polímero con gran capacidad de intercambio), presentando fuertes interacciones y formación de complejos con sales de hierro y aluminio (Fe y Al) como agentes coagulantes (Barrenechea, 2004; Kloster *et al.*, 2013; Watson *et al.*, 2016).

El profundizar en el conocimiento de los AHs como los componentes principales y más abundantes de las SHs y de la materia orgánica en general, ayuda a contribuir el comportamiento de estas macromoléculas en diferentes escenarios naturales sobre todo en suelo y agua, sin embargo, también nos permite contribuir en el área de ciencias de los materiales, enfocando nuestra investigación al análisis del comportamiento fotofísico de los AHs en solución y mediante la interacción con metales di y trivalentes por espectroscopia de fluorescencia.

En relación con el método de análisis espectroscópico, se mencionan algunos parámetros relevantes y que pueden aportar mucha información como son los máximos de emisión de fluorescencia (λ_F) y rendimientos cuánticos (Φ_{FL}) que vienen siendo independientes de la concentración de los AHs, sin embargo, estos parámetros dependen de la longitud de onda de excitación y de la naturaleza de los ácidos, lo que indica diferencias en los cromóforos presentes en estos materiales orgánicos. El análisis de las matrices de excitación-emisión

(MEE) de fluorescencia pueden dividirse en 5 regiones (Figura 2), los picos en cada región han sido asignados por diferentes autores a compuestos orgánicos (húmico, fúlvico, tirosínicos, triptofánicos o fenólicos), estas MEE nos aportan información para entender evaluar y analizar a los AHs (Artinger *et al.*, 2000; Baker, 2002; Chen *et al.*, 2003).

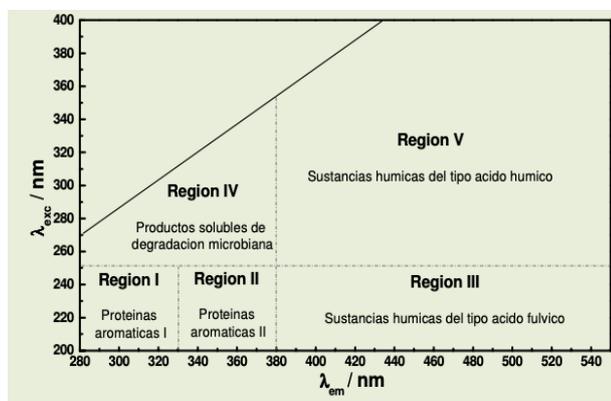


Figura 2: Regiones de las MEE (Artinger *et al.*, 2000; Baker, 2002; Chen *et al.*, 2003).

El análisis de las MEE y la relación con la variación del rendimiento cuántico de fluorescencia, proporcionan información útil para monitorear el grado de oxidación de los grupos sustituyentes de los AHs, estos se modifican por la incorporación de grupos donantes de electrones, como los grupos fenólicos o aceptores de electrones, como son los grupos carboxílicos, el número promedio de grupos fluoróforos y el ensanchamiento y desplazamiento hacia la región V de las SHs y la fracción de húmicos (Figura 2).

En el presente trabajo de investigación nos enfocamos en la caracterización (acidez total, cantidad de grupos funcionales principales: -COOH e -OH y espectroscopia UV-VIS a partir del cociente E_4/E_6) y el análisis de los AHs por espectroscopia de fluorescencia, evaluando sus propiedades fluorescentes y ópticas, que surgen de la absorción y emisión aproximadamente continua desde estados de transferencia de carga intramoleculares formados por grupos donadores (grupos aromáticos polihidroxilados, indoles, entre otros) y grupos aceptores más oxidados (por ejemplo, otros aromáticos oxidados o quinonas), todo esto se refleja en el grado de humificación y en la interacción del AH con diferentes metales di y trivalentes (Caracterización de sustancias húmica, 2023).

2. Desarrollo Experimental

2.1. Obtención de los AHs

Se obtuvieron muestras de diferentes suelos (Atotonilco, Tulancingo, Tolcayuca y Huasca de Ocampo) del estado de Hidalgo, México, identificados como suelos no contaminados o nombrados por los agrónomos y ambientalistas como un suelo cero, en relación con lugares alejados de la civilización y suelos de cultivo como es el caso del suelo de Tolcayuca Hidalgo, México. Son suelos de lugares boscosos con una

constante degradación y transformación de la biomasa vegetal y animal (Schnitzer, 1991; Schulten and Hempfling, 1992).

Se realiza la recolección de aproximadamente 1 kg de muestra de suelo en cada uno de los lugares mencionados, escarbando un promedio entre 15-20 cm de profundidad por debajo de la superficie en la capa arable u horizonte A. Posteriormente, a las muestras se les elimina basura, objetos metálicos, piedras y raíces, se colocan y expanden en charolas de aluminio para secarlas en un horno convencional a una temperatura de 60 °C durante 2 h (equipo LINDBERG, modelo GO1310A-1), finalmente cada muestra se tamiza hasta obtener tamaños de partícula adecuados (2.0 y 1.0 mm), se fueron colocando en recipientes de vidrio completamente limpios y herméticos. Para la extracción de los AHs se utiliza el método de Kononova (1982), es un método sobre todo no agresivo, rápido y económico, sin embargo, los rendimientos de extracción son bajos en comparación con el método propuesto por la IHSS (Licona, 2007; Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas, 2023).

Se obtuvieron los AHs de cuatro muestras de suelos diferentes como se mencionó, los cuales se etiquetan como AH-A (suelo de Atotonilco), AH-T (suelo de Tulancingo), AH-To (suelo de Tolcayuca) y AH-Hu (suelo de Huasca de Ocampo), se incluyeron dos AHs comerciales nombrados como AH-CH (Chemapex Praha S.R.O.) y AH-Le (Leonardita). Posteriormente, fueron caracterizados mediante métodos volumétricos (titulaciones ácido-base) y espectroscópicos (espectroscopia UV-VIS) (Nieto, 2010; Carpio, 2017; Nieto, 2017; Nieto, 2019).

2.2. Caracterización de los AHs mediante la determinación de la acidez total y cantidad de grupos carboxílicos e hidróxidos fenólicos.

La acidez total (grupos: -COOH y -OH) se determina por el método de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (barita cáustica) (Ritchie y Perdue, 2003; Plaza *et al.*, 2006). Se pesan 50 mg de AH, se agregan en un matraz Erlenmeyer de 125 mL (se realizó por triplicado y un blanco), con 20 mL de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$ 0.2 N, se favorecen condiciones anaerobias utilizando atmósfera de nitrógeno (burbujeando nitrógeno) e inmediatamente tapando el matraz con una septa. Posteriormente, la mezcla se mantiene agitando durante 24 h a temperatura ambiente; transcurrido el tiempo se filtra la suspensión lavando el residuo con agua destilada libre de CO_2 para titular de forma potenciométrica el filtrado con una solución 0.5 N de HCl hasta llegar a pH de 8.4 ± 0.3 . Para el cálculo se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{AT} = [(\text{V}_b - \text{V}_m) \times \text{N} \times 1000] / \text{mg}_{(\text{muestra})} \quad (1)$$

(Donde: AT = Acidez Total del AH, V_b = volúmen gastado en el blanco, V_m = volúmen gastado en la muestra de AH, N = concentración Normal del HCl, $\text{mg}_{(\text{muestra})}$ = cantidad de AH).

Para la determinación de grupos carboxílicos se utiliza el método de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, se pesan 50 mg de AH, se colocan en un matraz Erlenmeyer de 125 mL (se realizó por triplicado y una disolución como blanco), con 10 mL de $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 1 N y 40 mL de agua destilada libre de CO_2 ; posteriormente, la mezcla se agita durante 24 h a temperatura

ambiente y transcurrido el tiempo, se filtra la suspensión lavando el residuo con agua destilada libre de CO₂. Finalmente se titula el filtrado de forma potenciométrica con una solución 0.1 N de NaOH hasta llegar a pH de 9.8 ± 0.3 . Para el cálculo se utiliza la siguiente ecuación:

$$\text{meq g}^{-1} \text{COOH} = [(V_m - V_b) \times N \times 1000] / \text{mg}_{(\text{muestra})} \quad (2)$$

(Donde: meq g⁻¹ COOH = miliequivalentes de COOH por gramo de AH, V_m = volumen gastado en la muestra de AH, V_b = volumen gastado en el blanco, N = concentración Normal del NaOH, mg_(muestra) = cantidad de AH).

La cantidad de grupos hidróxidos fenólicos se calcula por diferencia entre la acidez total y la acidez de los grupos carboxílicos.

2.3. Caracterización de los AHs por espectroscopia UV-VIS

La preparación de la disolución patrón de AH con una concentración de 1000 mg/L: se pesan 10 mg de ácido húmico en 360 µL de NaOH 1.0 N y se afora con agua desionizada hasta 10 mL (Pacheco, 2002).

La propiedad espectroscópica como es el valor del cociente E₄/E₆ se determina en un equipo Perkin Elmer modelo Lambda 40, en el cual se obtuvieron los espectros a longitudes de onda desde 200 a 700 nm a partir de una disolución de 10 mg/L de AH (dilución de la solución patrón de 1000 mg/L), registrando las absorbancias a las longitudes de onda de 465 y 665 nm. Se determina la relación o el cociente E₄/E₆ (absorbancia de 465 nm dividida entre la absorbancia de 665 nm), parámetro utilizado para correlacionar el grado de humificación (Chin *et al.*, 1994).

2.4. Evaluación de los AHs por espectroscopia de fluorescencia

Para llevar a cabo el análisis y evaluación fluorométrica de los AHs y de la interacción de estos ácido en presencia de cationes metálicos (Me), di y trivalentes (Ca, Mg, Fe (III) y Al), AHs-Me. Primero se realiza la preparación de las disoluciones patrón de cada una de las sales del metal correspondiente con una concentración de 10 mM, a partir de CaCl₂, MgSO₄, Fe(ClO₄)₃ y Al(ClO₄)₃ · 9H₂O, con 98% de pureza (SIGMA-ALDRICH). La solución patrón de cada húmico fue descrita en el apartado anterior.

En la obtención de los espectros de fluorescencia en los modos de excitación-emisión, barrido sincrónico, la intensidad de fluorescencia y el área bajo la curva de emisión a partir de las disoluciones de cada AH con una concentración 50 mg/L y las respectivas disoluciones tratadas en presencia del metal con una concentración de 3 mM, ajustando cada una de las disoluciones a pH de 5 y realizando una microfiltración con membranas PALL de 0.2 µm (He *et al.*, 2007). El método se lleva a cabo en un espectrofotómetro de fluorescencia, modelo Perkin Elmer precisely LS55. Para establecer los parámetros adecuados, se ajustan las rendijas de excitación y emisión en un ancho de banda de 5 y 7 nm respectivamente, se seleccionan

velocidades de escaneo de 100 y 500 nm min⁻¹ para ambos monocromadores. Los espectros de emisión se registran en el intervalo de 340 a 600 nm estableciendo la longitud de onda de excitación fija de 360 y 450 nm. Los espectros de excitación de barrido sincrónico se miden escaneando simultáneamente las longitudes de onda de excitación y emisión de 300 a 550 nm, manteniendo una diferencia de longitud de onda constante y optimizada $\Delta\lambda = \lambda_{em} - \lambda_{ex} = 18 \text{ nm}$ (Cavoski *et al.*, 2009).

Posteriormente, se realiza el cálculo correspondiente para la obtención del rendimiento cuántico para los seis AHs en ausencia del metal a partir de la ecuación (3), sustituyendo el rendimiento cuántico del estándar, $\phi_{\text{estándar}}$, (sulfato de quinina en una solución de 0.1 M de H₂SO₄), las absorbancias (*A*) del estándar y del AH a una longitud de onda de $\lambda = 450 \text{ nm}$ y el área bajo la curva (*F*) del espectro de emisión a una longitud de onda de $\lambda_{ex} = 450 \text{ nm}$, donde presenta una mayor absorbancia (espectros de absorbancia definidos), en comparación con la longitud de onda de excitación de $\lambda_{exc} = 360 \text{ nm}$, las absorbancias se obtuvieron en un espectrofotómetro UV-Vis, Perkin Elmer modelo Lambda XLS, y finalmente se sustituyó el índice de refracción (η) del disolvente (agua).

$$\phi_m = \phi_{\text{estándar}} + [(A_{\text{estándar}} \times F_{(\text{área})\text{muestra}}) / (A_{\text{muestra}} \times F_{(\text{área})\text{estándar}})] \times (\eta_{\text{disolvente muestra}} / \eta_{\text{disolvente estándar}})^2 \quad (3)$$

Esperando describir de esta manera el grado de humificación y por ende su tamaño molecular.

3. Resultados y Discusión

En lo que se refiere a la caracterización de los AHs (AH-CH, AH-A, AH-T, AH-To y AH-Hu) a continuación se presentan los resultados obtenidos.

3.1. Caracterización de los AHs mediante la determinación de la acidez total y cantidad de grupos carboxílicos e hidróxidos fenólicos

En los AHs, la presencia de los grupos carboxílicos e hidróxidos fenólico se considera como una vía directa de humificación. A partir de los cálculos con las ecuaciones (1) y (2) (acidez total y cantidad de carboxílicos). En la tabla 1 se observa como el valor de la acidez total decrece en el siguiente orden: AH-A > AH-CH > AH-To > AH-Le > AH-T > AH-Hu, respecto a la cantidad de ácidos carboxílicos decrece en el siguiente orden: AH-A > AH-Hu > AH-CH > AH-To > AH-Le > AH-T, y finalmente la cantidad de hidróxidos fenólicos decrece en el siguiente orden: AH-A > AH-CH > AH-Le > AH-T > AH-To > AH-Hu. Sin embargo, en lo que respecta al AH-Hu presenta una menor acidez y una mínima cantidad de grupos hidróxidos fenólicos, lo opuesto al AH-Le en el cual predominan los grupos hidróxidos fenólicos. No obstante, todos los valores para el AH-CH y AH-To se encuentran con una gran similitud considerando una mayor cantidad de hidróxidos fenólicos en comparación con los ácidos carboxílicos.

Tabla 1: Propiedades de los AHs en estudio

ÁCIDOS HÚMICOS						
	AH-CH	AH-Le	AH-A	AH-T	AH-To	AH-Hu
Acidez total (meq g ⁻¹)	8.00(4.06)	6.12(2.12)	10.55(3.28)	5.58(2.96)	6.67(2.71)	4.00(1.69)
COOH (meq g ⁻¹)	3.33(1.36)	1.98(5.55)	4.58(3.22)	1.88(13.24)	3.00(5.56)	3.93(2.55)
OH (meq g ⁻¹)	4.67(2.71)	4.14(5.78)	5.97(6.24)	3.70(8.10)	3.67(5.56)	0.07(2.55)
E ₄ /E ₆	2.09(1.26)	2.33(0.91)	4.26(1.05)	2.06(1.00)	3.82(13.46)	5.52(9.03)

* % DER entre paréntesis para un total de tres análisis.

3.2. Caracterización de los AHs por espectroscopia UV-VIS

Los espectros de los AHs por espectroscopia UV-VIS presentan la misma tendencia o comportamiento, sin embargo, existen pequeñas diferencias en las absorbancias (Figura 3), lo que resulta en los diferentes valores en su respectivo cociente E₄/E₆ (Tabla 1).

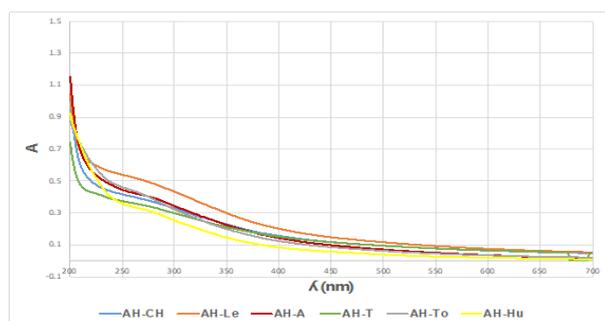


Figura 3: Espectros de los AHs (10 mg/L) por espectroscopia UV-VIS.

Lo cual indican, que la disminución en el cociente E₄/E₆, se relaciona con el aumento de la condensación molecular de los AHs, debido a la mayor capacidad de absorción en la región de las longitudes de onda correspondientes al rojo en el espectro visible (Stevenson, 1994). Se presenta el siguiente orden decreciente: AH-T > AH-CH > AH-Le > AH-To > AH-A > AH-Hu (Lead et al., 2003). El orden observado se asocia con el incremento en el grado de condensación molecular y la aromaticidad, las que son proporcionales al grado de humificación y maduración de los AHs. Sin embargo, con los valores obtenidos del cociente E₄/E₆ para el AH-Hu presentó un valor mayor a 5, que se relaciona con la presencia de cadenas alifáticas (carbohidratos, aminoácidos, péptidos, entre otros).

3.4. Evaluación de los AHs por espectroscopia de fluorescencia

Se analizó cada espectro obtenido de los AHs sin la presencia del metal y posteriormente, en presencia del metal (Ca, Mg, Fe(III) y Al), con la finalidad de evaluar las interacciones: AH-Me, todas las disoluciones se analizaron por duplicado (total de 60 disoluciones). De esta manera se obtuvieron los espectros de excitación y emisión, registrando los espectros de emisión primero a una longitud de onda de excitación de λ_{exc} = 360 nm para los intervalos de 360 a 650 nm y posteriormente, los espectros de emisión a una longitud de onda de excitación de λ_{exc} = 450 nm para los intervalos de 450 a 750 nm.

No obstante, se estableció el método de análisis con espectros de emisión solo a intervalos de 450 a 750 nm aproximadamente, con una longitud de onda de excitación de λ_{exc} = 450 nm, puesto que mostró las absorbancias adecuadas en el espectro visible (Figura 4).

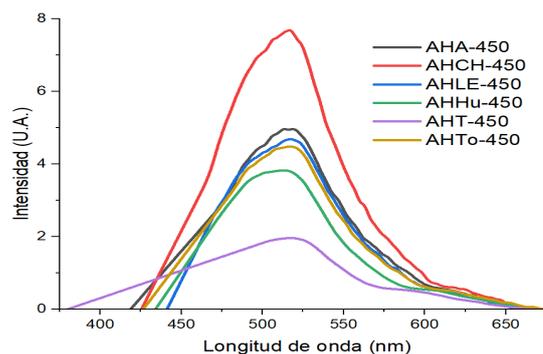


Figura 4: Espectros de los AHs (50 mg/L) por espectroscopia UV-VIS.

Se ajustó la rendija de excitación a 5 nm respectivamente, utilizando una longitud de onda constante y optimizada de 18 nm, programando una velocidad de exploración de 100 nm min⁻¹ para ambos monocromadores, presentando los espectros en la siguiente figura 5:

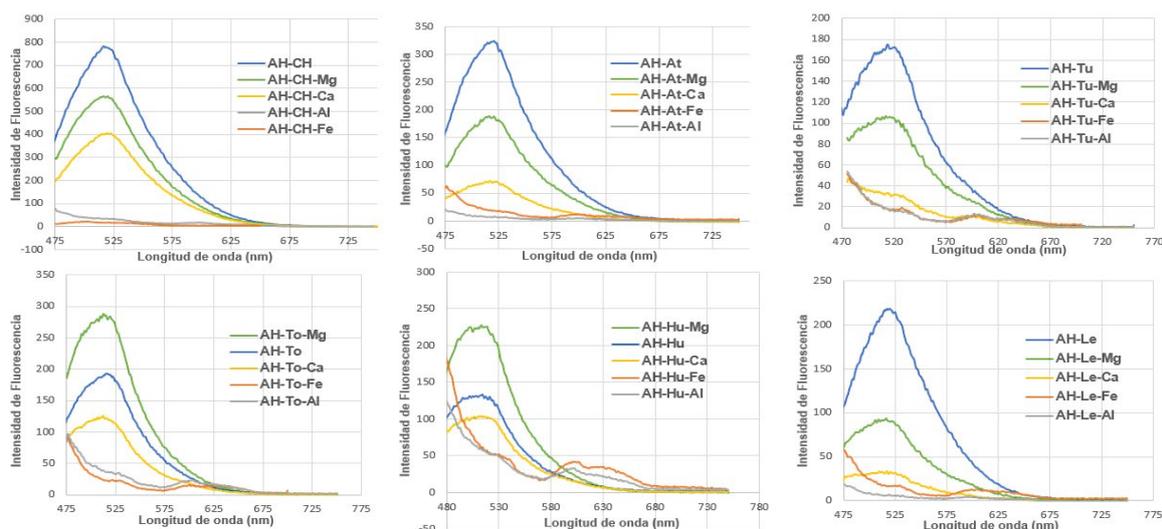


Figura 5: Espectros de emisión de los AHs y AHs-Me (Ca, Mg, Fe(III) y Al) por espectroscopia de Fluorescencia.

En los espectros de emisión por fluorescencia se observa la misma tendencia para todas las disoluciones (máximos de emisión de fluorescencia $\approx \lambda_F = 475 - 530$ nm), es decir, una mayor intensidad de fluorescencia para los AHs en disolución y una menor intensidad cuando el AH interactúa con el metal (AH-Me). Se relacionan interacciones electrostáticas y formación de puentes de hidrógeno para el AH-Ca y AH-Mg hasta la formación de complejos metálicos con AH-Fe y AH-Al, donde presentan interacciones con mayor fuerza y una menor intensidad de fluorescencia. Sin embargo, para el AH-To y el AH-Hu predomina la intensidad de fluorescencia cuando están interactuando con el metal Mg, se puede relacionar con la inestabilidad química de estos AHs en solución, es decir, menor grado de humificación (condensación molecular), aromaticidad y diferencias en los grupos cromóforos (Kucerík *et al.*, 2004).

En la obtención de los rendimientos cuánticos para los AHs analizados a una longitud de onda de excitación de $\lambda_{exc} = 450$ nm, puesto que mostró una absorbancia definida (Figura 4). De esta manera, con la longitud de onda adecuada se obtuvo el área bajo la curva de los picos de emisión en cada uno de los espectros de fluorescencia del AH (Figura 5), mediante el Software Estadístico Origin (Versión 9.65), para su posterior comparación con el área bajo la curva del estándar (sulfato de quinina).

El rendimiento cuántico del AH (ϕ_{AH}) se relaciona entre el número de moléculas totales y el número de moléculas totales excitadas que pueden emitir fluorescencia, presentando los valores en la tabla siguiente:

Tabla 2: Rendimientos cuánticos para los AHs (AH-CH, AH-Le, AH-A, AH-T, AH-To y AH-Hu). Estándar sulfato de quinina

	Absorbancia ($\lambda = 450$ nm)	Área bajo la curva del espectro de emisión	Índice de refracción del solvente (agua a 25 °C)	Rendimientos cuánticos (ϕ_{AH})
Estándar	0.046	79052.8	1.3342	0.54
AH-CH	0.045	719.789	1.3342	0.0053
AH-Le	0.061	436.287	1.3342	0.0022
AH-A	0.041	487.117	1.3342	0.0037
AH-T	0.066	241.280	1.3342	0.0011
AH-To	0.063	441.800	1.3342	0.0022
AH-Hu	0.038	364.901	1.3342	0.0030

En particular, los rendimientos cuánticos de los AHs (ϕ_{AH}), son valores muy similares y pequeños que se relacionan con la composición compleja y de gran tamaño molecular, con la presencia de anillos aromáticos condensados con grupos carboxílicos (-COOH) y otros compuesto con múltiples enlaces insaturados (-C=C-), es decir, un elevado grado de fluoróforos conjugados y grupos aceptores de electrones (-C=O, -COOH, -OH, etc.), lo que indica AHs humificados, no obstante, debido a la

complejidad cromofórica es lo que hace que presente una actividad óptica de la gran cantidad de emisiones de fotones.

Evaluando la interacción del AH con el metal a las condiciones establecidas, se presenta el siguiente orden de interacción: AH-Al > AH-Fe > AH-Ca > AH-Mg (Peng Kang *et al.*, 2018), al disminuir la intensidad de fluorescencia y aunado a ello, lograr comprender el comportamiento de la macromolécula del AH en sistemas naturales como en el

suelo o en el agua, en relación con la movilidad o disponibilidad del metal y como un posible material fluorescente (Troconis, 2010; Shunan *et al.*, 2021).

4. Conclusiones

Los AHs evaluados, presentaron ser polímeros muy condensados y humificados en diferente proporción, no obstante, las propiedades fluorescentes de estos ácidos surgen de la absorción y emisión continua, desde estados de transferencia de carga intramoleculares formados por sus grupos donores y aceptores oxidados como los hidróxidos fenólicos y los ácidos carboxílicos (-OH y -COOH).

El comportamiento fisicoquímico de la macromolécula del húmico al interactuar con cada uno de los metales: *AH-Me*, nos revela la posible movilidad o disponibilidad de los metales tanto en el suelo o en el agua, cumpliendo una función de agentes coagulantes. Así como la posibilidad de utilizar a los *AHs-Me* como materiales fluorescentes, siendo una perspectiva y continuidad de este trabajo de investigación.

Agradecimientos

Silvia Nieto Velázquez agradece el financiamiento PRODEP, convenio no. 511-6/18-8644.

Referencias

- Almendros, G. (2008). Revisión analítica de sustancias húmicas en suelos y compost. *soilACE* 239-255. Recuperado el 2 de mayo de 2018 de: https://www.soilace.com/pdf/pon2008/d26/Cas/04_GAlmendros.pdf.
- Artinger, R. G., Buckau, S., Geyer, P., Fritz, M., Wolf, J. I., Kim. (2000). Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry* 15, 97–116.
- Baker, A. (2002). Fluorescence excitation-emission matrix characterization of river waters impacted by a tissue mill effluent. *Environ.Sci.Technol* 36, 1377-1382.
- Barrenechea, M. A. (2004). Coagulación de Materia Orgánica (Capítulo 4). Lima. Recuperado el 13 de junio de 2022 de: <http://www.ingenieroambiental.com/4014/cuatro.pdf>
- Camargo, V. M., Cruz, T. L. E. (1999). Sustancias Húmicas en Aguas Para Abastecimiento. *Revista Ingeniería e Investigación* 44, 63-72.
- Caracterización de sustancias húmica (Capítulo 3), 44-63. Recuperado 14/05/2021. Valores reportados en: <http://www.ihss.gatech.edu/elements.html>.
- Carpio, D. K. (2017). Análisis fisicoquímico de ácidos húmicos y evaluación cinética de su agregación con iones Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Cavoski, I., D'Orazio, V., Teodoro, M. (2009). Interaction mechanisms between rotenone and humic acids. *Anal. Bioanal. Chem*, 395 (4), 1145-1158.
- Cerisola, C. (2015). La Materia Orgánica Edáfica. Manejo y Conservación de Suelos. Departamento de Ambiente y Recursos Naturales. UNLP. p. 19. Recuperado el 19 de octubre de 2023 de: <https://www.intagri.com/articulos/suelos/humus-huminas-acidos-humicos-y-acidos-fulvicos>.
- Chen, W., Westerhoff, P., Leenheer, J. A., Booksh, K. (2003). Fluorescence excitation- emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter. *Environ.Sci.Technol* 37, 5701–5710
- Chin, Y. P., Alken, G., Loughlin, E. O. (1994). Molecular weight, polydispersity, and spectroscopic properties of aquatic humic substances. *Environ. Sci. Technol* 28, 1853 – 1858.
- Gomes-de Melo, B. A., Lopes-Motta, F., Andrade-Santana, M. H. (2016). Humic acids: Structural properties and multiple functionalities for novel technological developments. *ScienceDirect* 62, 967-974.
- He, Z., Traina, S. J., Weavers, L. (2007). Sonolytic desorption of mercury from aluminum oxide: effects of pH, chloride and organic matter. *Environ. Sci. Technol* 41, 779-784.
- Humintech GmbH. (19 de abril 2023). Tratamiento de aguas residuales. <https://www.humintech.com/es/industria/aplicaciones/tratamiento-de-aguas-residuales>.
- Kloster, N., Brigante, M., Zanini, G., Avena, M., (2013). Aggregation kinetics of humic acids in the presence of calcium ions. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects* 427, 76 - 82.
- Kononova, M. M. (1982). *Materia orgánica del suelo*. 1ª Ed. Oikos-tau, Barcelona, España, 63-105.
- Kuceric, J., Kovár, J., Pekar, M. (2004). Thermoanalytical investigation of lignite humic acids fractions. *J. of Termal Análisis and Calorimetry* 76, 6242-6252.
- Lead, J. R., Starchev, K., Wilkinson, K. J. (2003). Diffusion coefficients of humic substances in agarose gel and in water. *Environ. Sci.Technol* 37(3), 482-487.
- Licona, S. T. J. (2007). Extracción y análisis fisicoquímico de ácidos húmicos y su interacción con Cu(II) y Pb(II). Tesis de Licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Nieto, V. S. (2010). Estabilidad de los ácidos húmicos y su influencia en la interacción con Cu(II) y Pb(II). Tesis de Doctorado, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, México.
- Nieto, V. S. (2017). Evaluación del efecto de las cinéticas de agregación de los ácidos húmicos (AHs) en presencia de Na^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} . *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química* 3, 154 – 162.
- Nieto-Velázquez, S., Villagrán-Manilla, A., Ibarra-Coria, E. D. (2019). Evaluación y análisis de cinéticas de agregación de los ácidos húmicos en presencia de Al^{3+} por espectroscopi UV-VIS. *Tópicos de Investigación en Ciencias de la Tierra y Materiales*, 6, 72-79.
- Pacheco, M. L. (2002). Capillary Electrophoresis and MALDI-TOF mass spectrometry of humic acids. Tesis de Doctorado, Departamento de Química Analítica, Facultad de Ciencias, Universidad de Masaryk, República Checa.
- Plaza C., Brunetti G., senesi N., Polo A. (2006). Molecular and quantitative analysis of metal ion binding to humic acids from sewage sludge and sludge-amended soils by fluorescence spectroscopy. *Environ. Sci. Technol.*, (3), 40: 917–923.
- Penggang, J., Jina, S., Xiaochang, C. W., Xin., J. (2018). Two-dimensional correlation spectroscopic analysis on the interaction between humic acids and aluminum coagulant. *Journal of Environmental Sciences*. 64, 181-189.
- Ritchie J. D., Perdue E. M. (2003). Proton-binding study of standard and reference fulvic acids, humic acids, and natural organic matter. *Geochim. Cosmochim*, 67, 85-96.
- Schnitzer, M. (1991). Soil organic matter. *Soil Sci.* 151, 41 – 58.
- Schulten, H. R., Hempfling, R. (1992). Influence of agricultural and management on humus composition and dynamics: Classical and modern analytical techniques. *Plant Soil* 142, 259 – 271.
- Shunan, D., Wangwei, C., Jihong, X., Liting, S., Weimu, W., Hui, L. (2021). Aggregation kinetics of fragmental PET nanoplastics in aqueous environment: complex roles of electrolytes, pH and humic acid. *Environmental Pollution* 268.
- Sociedad Internacional de Sustancias Húmicas (19 de octubre de 2023). What are Humic Substances?. <https://humic-substances.org>.
- Stevenson, F. J. (1992). *Humus Chemistry*. 2ª Ed. Wiley/Inter-science, New York. p. 213-217.
- Troconis, A. (2010). Tratamiento de aguas residuales. Recuperado 14/05/2021 https://www.belzona.com/es/solution_maps/wastewater/money_map.pdf
- Watson, M. A., Tubi'c, A., Agbaba, J., Niki'c, J., Maleti'c, S., Molnar, Jazi'c, J., Dalmacija, B., (2016). Response surface methodology investigation into the interactions between arsenic and humic acid in water during the coagulation process. *J. Hazardous Materials* 312, 150 -158.