

Mayra Mora^{1,2}, Manuel Palencia^{2*}, Enrique Combatt³

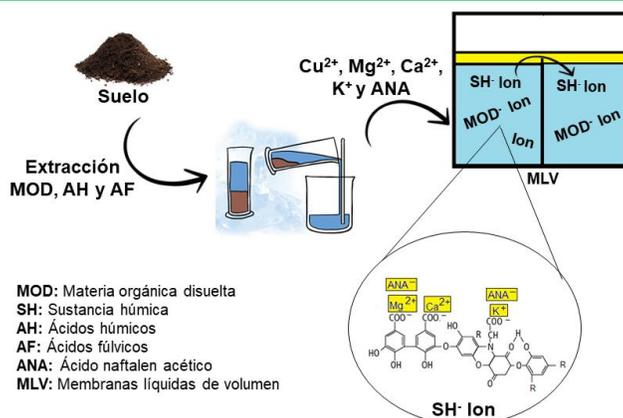
¹ Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia

² Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia

³ Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería - Colombia

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Graphical abstract



Efecto de la materia orgánica disuelta y sustancias húmicas en el transporte de iones y moléculas de bajo peso molecular mediante membranas líquida

Resumen

La materia orgánica del suelo puede clasificarse según diferentes criterios, incluida la solubilidad en agua, el estado y la susceptibilidad a la biodegradación, entre otros. En general, el transporte de sustancias inorgánicas y orgánicas en el agua y el suelo puede estar fuertemente influenciado por la movilidad de la materia orgánica natural disuelta (MOD) y por los contenidos de materia orgánica humificada (MOH). Por otro lado, los sistemas de membrana líquida (ML) son estructuras complejas formadas por una fase líquida que pueden usarse para producir una partición de diferentes sustancias en función de las propiedades de difusión y bajo diferentes condiciones. En este trabajo, se utilizaron sistemas de membranas líquidas para estudiar el efecto de los ácidos húmicos (AH), ácido fúlvico (AF) y MOD sobre el transporte de iones (elementos mayores y menores como Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ , entre otros) y moléculas de bajo peso molecular como el ácido naftalen acético (ANA). Observándose que es posible el transporte de los iones debido a reacciones de complejación con las SH y MOD, los cuales a su vez forman puentes que permiten la interacción de las SH y MOD con aniones orgánicos tales como el ANA.

Palabras claves

Sustancias húmicas
 Membranas líquidas
 Materia orgánica disuelta
 Suelo

Effect of dissolved organic matter and humic substances on transport of ions and low molecular weight molecules by liquid membranes

Abstract

Soil organic matter can be classified according to different criteria, including solubility in water, status and susceptibility to biodegradation, among others. In general, the transport of inorganic and organic substances in water and soil can be strongly influenced by the mobility of dissolved natural organic matter (DOM) and the contents of humified organic matter (HOM). On the other hand, liquid membrane systems (LM) are complex structures formed by a liquid phase that can be used to produce a partition of different substances depending on the diffusion properties and different conditions. In this work, liquid membrane systems were used to study the effect of humic acids (HA), fulvic acid (FA) and DOM on the transport of ions (major and minor elements such as Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} and K^+ among others) and low molecular weight molecules like naphthalene acetic acid (NAA). Observing that it is possible the transport of ions mainly due to complexation reactions with HS and DOM, which in turn form bridges that allow the interaction of HS and DOM with organic anions such as NAA.

Keywords

Humic substances
Liquid membranes
Dissolved organic matter
Soil

Received: 08-01-2018

Accepted: 02-05-2018

Publishing date: 15 - May - 2018

Revision Code: 20180908-MEBN [Pag. 40 -48]

Corresponding author:

manuel.palencia@correounivalle.edu.co



Efecto de la materia orgánica disuelta y sustancias húmicas en el transporte de iones y moléculas de bajo peso molecular mediante membranas líquida

Mayra Mora^{1,2}, Manuel Palencia^{2*}, Enrique Combatt³

¹ *Mindtech Research Group (Mindtech-RG), Mindtech S.A.S., Cali – Colombia*

² *Departamento de Química, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad del Valle, Cali – Colombia*

³ *Departamento de Ingeniería Agrícola y Desarrollo Rural, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería - Colombia*

Corresponding author: manuel.palencia@correounivalle.edu.co

Resumen

La materia orgánica del suelo puede clasificarse según diferentes criterios, incluida la solubilidad en agua, el estado y la susceptibilidad a la biodegradación, entre otros. En general, el transporte de sustancias inorgánicas y orgánicas en el agua y el suelo puede estar fuertemente influenciado por la movilidad de la materia orgánica natural disuelta (MOD) y por los contenidos de materia orgánica humificada (MOH). Por otro lado, los sistemas de membrana líquida (ML) son estructuras complejas formadas por una fase líquida que pueden usarse para producir una partición de diferentes sustancias en función de las propiedades de difusión y bajo diferentes condiciones. En este trabajo, se utilizaron sistemas de membranas líquidas para estudiar el efecto de los ácidos húmicos (AH), ácido fúlvico (AF) y MOD sobre el transporte de iones (elementos mayores y menores como Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ , entre otros) y moléculas de bajo peso molecular como el ácido naftalen acético (ANA). Observándose que es posible el transporte de los iones debido a reacciones de complejación con las SH y MOD, los cuales a su vez forman puentes que permiten la interacción de las SH y MOD con aniones orgánicos tales como el ANA.

Palabras Claves

Sustancias húmicas
Membranas líquidas
Materia orgánica disuelta
Suelo

1. Introducción

Las sustancias húmicas (SH) son un conjunto de compuestos orgánicos conformados por ácidos húmicos (AH), ácidos fúlvicos (AF) y humina (H), los cuales se caracterizan por otorgarle una coloración oscura al suelo y estar presente en casi todos los tipos de suelos y sedimentos. Hace más de 200 años estos compuestos orgánicos han sido objeto de investigación científica, por lo que se han realizado numerosos estudios para caracterizar y determinar la estructura de las SH, utilizando diversos métodos espectroscópicos no destructivos como resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia infrarroja (IR), ultravioleta-visible

(UV-visible) y fluorescencia, así como también, métodos destructivos tales como análisis elemental, pirólisis, cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y cromatografía de exclusión por tamaño de alta presión (HPSEC), donde estos métodos proporcionan información cualitativa y cuantitativa sobre la estructura de las SH [1]. Sin embargo, su estructura química es diversa debido a los diferentes procesos de formación, por lo que se ha logrado elucidar los bloques de construcción de dichas sustancias, observándose que en las estructuras de las SH se encuentran núcleos aromáticos oxidados (fenoles, metoxifenoles, furanos, pirroles y piridina) unidos por cadenas alifáticas (alcanos, alquenos, ácidos,

ésteres, etc.), que tienen grupos ácidos y alcoholes. Además, se ha reportado que las interacciones que presentan estas moléculas son débiles, como enlaces de hidrógeno, interacciones pi, interacciones de van der Waals, y fuerzas hidrofóbicas [2-5].

De acuerdo con la solubilidad de las sustancias húmicas en ácidos o bases de Brönsted, ha sido posible clasificarlos en tres fracciones, las cuales son: ácido húmico (AH), ácido fúlvico (AF) y humina (Hu). Generalmente, los ácidos húmicos y fúlvicos se extraen de los suelos o sedimentos con hidróxido de sodio, esta fracción soluble requiere un proceso adicional de extracción ya que contiene una combinación de AH y AF. Para lograr su separación, se varía el pH reduciéndose a un valor de 2 donde el precipitado corresponde a los AH, mientras que la fracción que permanece soluble corresponde a los AF. Por otra parte, la fracción no soluble de la extracción con hidróxido de sodio corresponde a la Hu [6].

Otro componente presente en la solución del suelo es la materia orgánica disuelta (MOD) la cual es una mezcla compleja de muchas moléculas y está definido operativamente como la materia orgánica que pasa un filtro de 0.45 μm siendo, en sentido estricto, una convención generalizada. Algunos autores consideran que, una gran parte de la MOD en la solución del suelo está presente como AH y AF, sin embargo, esto genera una superposición de conceptos que dificulta la comprensión. Por ende, la MOD puede fácilmente entenderse como la fracción que se encuentra presente en la fase líquida del suelo. Esto incluye, otros compuestos orgánicos incluyen ácidos macromoleculares hidrofílicos y compuestos orgánicos tales como carbohidratos, ácidos carboxílicos y aminoácidos [7].

Por otra parte, una membrana es una barrera delgada y semipermeable entre dos fases a través de la cual pueden ocurrir procesos de transferencia de masa mediante la aplicación de una fuerza directora [8]. En particular, para las membranas líquidas (ML), es posible tener dos configuraciones: (a) dos fases acuosas separadas por una fase aceitosa, o (b) dos fases aceitosas separadas por una fase acuosa. Cabe aclarar que, en sentido estricto, los términos “acuoso” y “aceitoso” son de naturaleza histórica y la condición que debe cumplirse entre las fases en contacto con una membrana líquida es la inmiscibilidad. En los sistemas de membranas líquidas, se reconocen tres fases, la fase de alimentación (FA), donde se encuentra la mezcla

que se desea separar; la fase de membrana (FM) y la fase de extracción (FE) donde se recolecta las sustancias fraccionadas o separadas. Además, puede identificarse dos interfaces (de alimentación y de extracción, correspondientes a las interfaces de contacto con la fase de membrana). Dependiendo de los mecanismos de transporte y del tipo de membrana líquida pueden identificarse diferentes características composicionales (por ejemplo, sustancias transportadoras y tensoactivos) [9].

En los procesos de separación por membrana existen dos mecanismos generales de separación, así, en membranas porosas el mecanismo habitual es el de exclusión por tamaños con excepción de la ósmosis inversa. Por otro lado, en ML la separación se logra mediante el mecanismo de disolución y posterior difusión de la sustancia en la fase de membrana. Dentro de las principales características de este tipo de procesos se puede destacar que es un proceso simple en concepto y operación, su escalamiento es sencillo con un relativamente bajo consumo de energía, una alta selectividad ya que, la separación depende de: (a) la afinidad del analito por la fase de membrana, la cual queda determinada por el coeficiente de partición entre las fase en contacto y (b) la migrabilidad relativa del analito en la fase de membranas respecto a las demás especies presentes, la cual queda determinada por sus respectivos coeficientes de difusión. Lo anterior ha permitido el uso de membranas líquidas en diversos campos como la química orgánica, inorgánica y analítica, ingeniería biomédica entre otros, para llevar a cabo aplicaciones de separaciones de gases, recuperación de metales valiosos o tóxicos, tratamiento de aguas residuales, fraccionamiento, separación o recuperación de compuestos orgánicos, etc. [10-13].

Como se mencionó anteriormente y de acuerdo con lo reportado en la literatura, hasta la fecha ha sido posible caracterizar en gran medida la estructura de las SHs de los suelos, sin embargo, actualmente se desconoce el efecto que tiene las SHs y la MOD en el transporte de iones y moléculas de bajo peso molecular en el suelo, razón por la cual en esta investigación se busca mediante el uso de ML, en particular, membranas líquidas en emulsión, conocer las diversas interacciones entre las SH, MOD y iones tanto metálicos como orgánicos. Con lo anterior, con el fin de monitorear su destino y movimiento en la disolución del suelo, haciendo uso de membranas líquidas, con lo que se pretende

comprender mejor las propiedades físico-químicas de estas sustancias del suelo.

2. Sección experimental

2.1 Extracción de materia orgánica disuelta (MOD) y sustancias húmicas (SH)

Para la extracción de la MOD se realizaron lavados sucesivos de una fracción de suelo (proveniente de El Carmelo, municipio del Valle del Cauca-Colombia) con agua destilada y posterior filtración. Las SH se extrajeron siguiendo la siguiente metodología: una fracción de la MOD se basificó hasta pH 12 con una solución 0,1 N de NaOH para la solubilización de los ácidos húmicos y fúlvicos, paso seguido se acidificó la mezcla hasta pH 2 mediante la adición de HCl 2,0 N con el fin de precipitar los AH, el fraccionamiento de AH y AF se completó por centrifugación a 5000 rpm durante 15 minutos. Finalmente se llevó a cabo la etapa de secado a 45 °C durante 48 h.

2.2. Preparación y caracterización operacional de las membranas líquidas de volumen (MLV)

Inicialmente se prepararon diferentes sistemas de MLV mediante sistemas tipo batch de celdas paralelas, esto con el fin de determinar cuál composición que proporciona mayor capacidad de fraccionamiento de las sustancias húmicas.

En las MLV se estudiaron 4 sistemas (S1, S2, S3 y S4), cada uno con su respectivo blanco, donde la principal diferencia entre ellos es la composición de la fase de alimentación. Esta FA en los 4 sistemas consiste en 3,0 mL de solución acuosa con una mezcla de iones metálicos (50 ppm de Cu^{2+} , Ca^{2+} , K^{+} y 25 ppm de Mg^{2+} , a partir de las sales CuCl_2 , CaCO_3 , KCl y $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ de Sigma Aldrich) y 160×10^{-4} mol/L de ácido naftalenacético (ANA, HORMONAGRO®), adicionalmente el S1, S2, S3 y S4 contienen 1000 ppm de AH, AF, MOD y una mezcla de las tres sustancias, respectivamente. La fase de membrana en todos los casos consta de 1,0 mL de etilmetilcetona (EMC, Merck); y para la fase de extracción se estudió una solución acuosa a diferentes valores de pH (4, 7 y 9). En cada sistema se tomaron alícuotas tanto en la fase de alimentación (FA), fase de membrana (FM) y fase de extracción (FE) a las 2, 4, 6 y 24 h, de las cuales se cuantificó por espectroscopia de fluorescencia (FP-8500

Jasco) la cantidad de AH, AF y MOD que difundió desde la FA hasta la FE, la concentración de ANA se cuantificó por espectroscopia UV-Vis (UV-1700 PharmaSpec-Shimadzu) a 282 nm y la concentración de iones metálicos se realizó por absorción atómica (AA-6300 Shimadzu).

3. Resultados y discusión

La espectroscopia de fluorescencia es una de las técnicas más empleadas para la caracterización de SHs del suelo dado que estas están conformadas por anillos aromáticos condensados, sistemas de enlaces insaturados, sustituyentes aceptores de electrones tales como grupos carbonilo y carboxilo, y poseen unidades de alto peso molecular, lo cual conlleva a un alto grado de conjugación y permite obtener espectros de emisión que generalmente se caracterizan por una única banda ancha donde es posible observar una longitud de onda máxima y una intensidad relativa de fluorescencia que depende principalmente de la naturaleza y el origen del material húmico [14-16].

Aprovechando las distintas propiedades de fluorescencia que las sustancias húmicas proporcionan, fue posible obtener criterios de diagnóstico útiles para distinguir entre AHs, AFs y MOD, tal como se muestra en la figura 1.

La caracterización realizada en el presente estudio, concuerda con lo reportado en la literatura (ver figura 2) donde la relación de bandas de excitación/emisión para los AHs se encuentra alrededor de 310/398 nm a causa de su mayor tamaño estructural y por ende mayor proporción de anillos aromáticos y mayor conjugación en su estructura, por lo que requiere de menor energía de excitación debido a la mayor proximidad entre los niveles de energía electrónicos, lo que se ve reflejado en mayores longitudes de onda de excitación. Mientras que los AFs, presentan menores tamaños estructurales y menor conjugación por lo que la banda de excitación se observa a menores longitudes de onda, ambas bandas se encuentran aproximadamente a 220/306 nm, por otro lado, las bandas de excitación y emisión de la MOD del suelo se encuentra a longitudes de onda más cortas, aproximadamente en 263/290 nm dado a que está compuesta por productos solubles resultado de la degradación microbiana, con estructuras simples de bajo peso molecular, bajo grado de policondensación aromática, bajos niveles

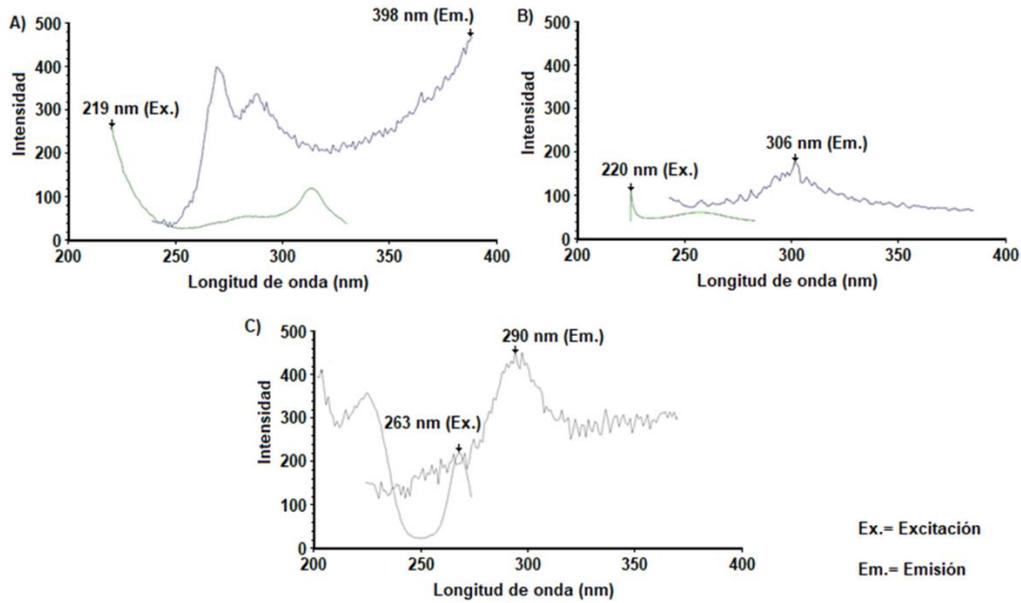


Figura 1. Caracterización de A) AH, B) AF y C) MOD mediante espectroscopía de fluorescencia

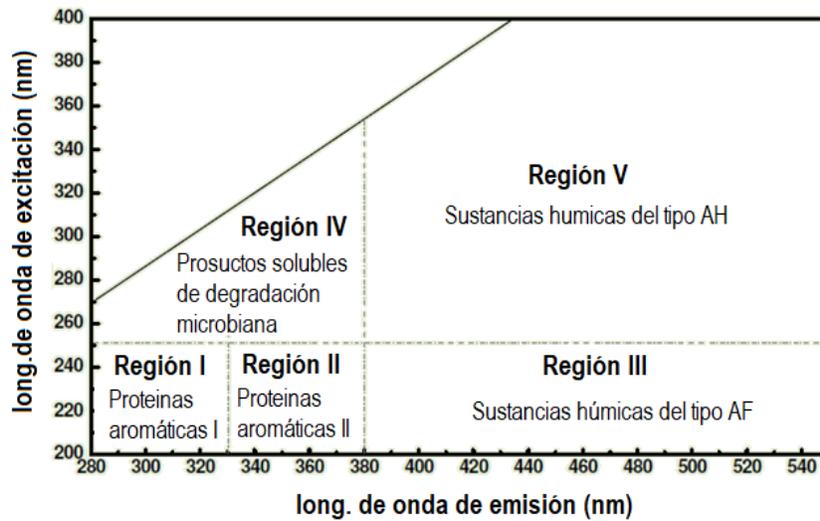


Figura 2. Relación $\lambda_{excitación}/\lambda_{emisión}$ de las sustancias húmicas [17].

de cromóforos conjugados y portadores de sustituyentes donantes de electrones tales como hidroxilos, metoxilos y grupos amino [17].

En los espectros obtenidos se observa la presencia de bandas anchas con ruido posiblemente a una alta proximidad de los diferentes cromóforos de las SH ($<10 \text{ \AA}$), lo que conlleva a un solapamiento orbital entre las moléculas donantes y receptoras de energía, siendo el intercambio de electrones o de interacción de cargas resonantes el mecanismo más probable de transferencia de energía [18].

Hasta la fecha se ha estudiado ampliamente las características estructurales y propiedades físicas y químicas de las sustancias húmicas, dentro de las cuales sobresale su capacidad de intercambio catiónico dado a su alta densidad de carga negativa correspondiente a los grupos ácidos carboxílicos desprotonados, especialmente en suelos alcalinos, sin embargo se desconoce el efecto que tienen las sustancias húmicas del suelo en el transporte de iones esenciales para las plantas, como lo son Cu^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} y K^+ en la solución del suelo, por ello se

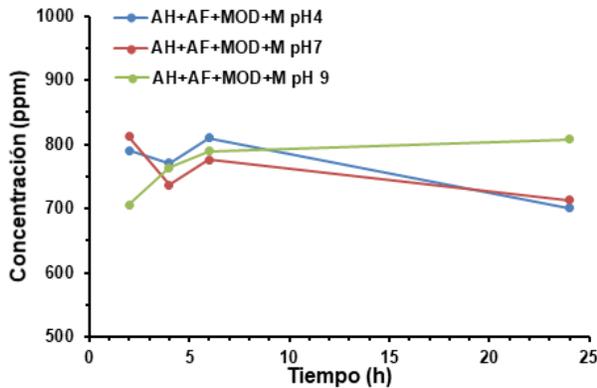


Figura 3. Difusión de sustancias húmicas y MOD desde la FA hasta la FE a diferentes valores de pH. Cuantificación realizada mediante espectroscopía de fluorescencia.

cuantificó la capacidad de transporte de iones mediado por AH, AF y MOD desde la fase de alimentación hasta la fase de extracción de un sistema de membranas líquidas de volumen, a continuación, se muestran los resultados obtenidos para cada sistema a diferentes valores de pH.

De acuerdo a la figura 3 se puede concluir que la difusión de las SH y MOD en el sistema de MLV muestra una pequeña preferencia por el medio básico dado a que dichas sustancias presentan una mejor solubilidad a altos valores de pH. Adicionalmente, se cuantificó la concentración de iones que las SH y MOD tienen la capacidad de transportar a través de una membrana compuesta por etil metil cetona, dichos resultados se grafican en la figura 4.

De acuerdo a la figura 4, es posible corroborar que efectivamente las SH tienen la capacidad de interactuar con cationes, como los iones cúpricos, iones de magnesio, calcio y potasio mediante

reacciones de complejación, lo cual a su vez permite el transporte de dichos iones, de acuerdo a la literatura, cada uno de estos cationes interactúan con los electrones libres presente en los oxígenos de los grupos aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos carboxílicos de las sustancias húmicas o MOD, también se ha reportado interacciones electrostáticas con los grupos ácidos carboxílicos desprotonados a pH 9 [7]. Este transporte de las sustancias húmicas desde la FA hasta la FE en el sistema de membranas líquidas se facilita gracias a los fenómenos de disolución-difusión, y se basa en un proceso en tres etapas: La disolución de la especie de interés en la fase de membrana, la subsecuente difusión desde la interfase interna a la interfase externa y la extracción en la fase receptora [8]. La primera etapa queda determinada por el coeficiente de distribución (k_D) entre las fases de alimentación y la fase de membrana y la segunda por el coeficiente de difusión (D) a través de la membrana, en consecuencia, la selectividad de la separación dependerá de las diferencias relativas de k_D y D entre las diferentes especies presentes en la alimentación. Por último, la tercera etapa dependerá de la estrategia de descarga utilizada [8]. La separación mediante membranas líquidas puede verse modificada mediante diferentes mecanismos de transporte, en particular, se destacan dos tipos: difusión pasiva y transporte acoplado, en esta investigación se llevó a cabo la difusión pasiva de las sustancias del suelo, donde su movimiento a través de la fase de membrana es promovido por la diferencia de potenciales químicos en las interfaces o/w y w/o de la membrana, a su vez, las SH hacían las veces de transportadores de los iones mediante acoplamiento con estos.

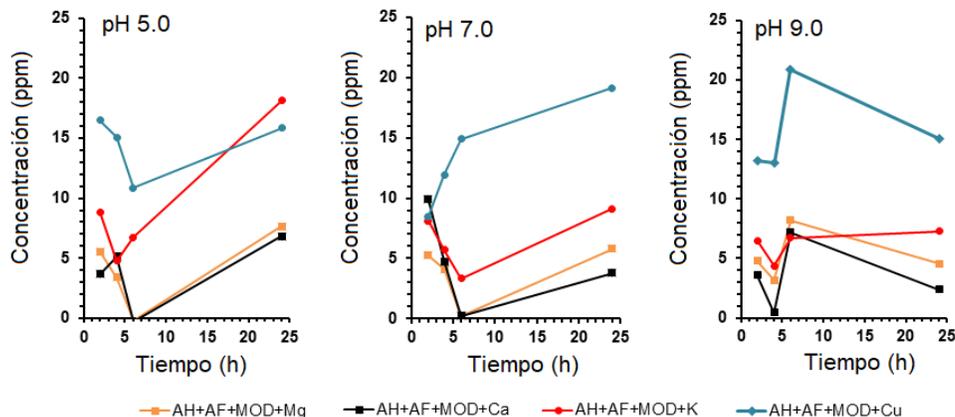


Figura 4. Difusión de iones metálicos desde la FA hasta la FE mediado por AH, AF y MOD a diferentes valores de pH. Cuantificación realizada por absorción atómica de llama.

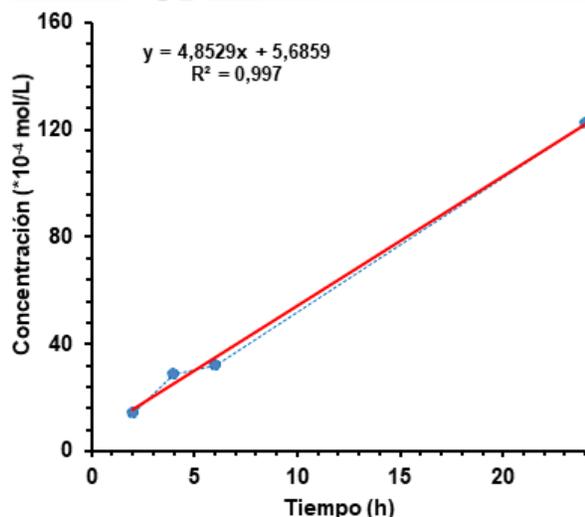


Figura 5. Difusión del ANA desde la FA hasta la FE mediado por AH, AF y MOD a pH 9. Cuantificación realizada por espectroscopía UV-vis a 282 nm.

Por otro lado, el ácido naftalen acético, en soluciones con valores de pH mayores a su pKa (4,24) se encuentra desprotonados, es decir, con una densidad de carga negativa, sin embargo, de acuerdo a la figura 5, fue posible la difusión de dicha sustancia gracias a que en la mezcla de estudio, las SH y MOD, interaccionan con los cationes en solución, los cuales hacen las veces de puente entre las SH y las especies aniónicas, como es el caso del ANA. Adicionalmente, se pueden presentar varios tipos de interacciones entre compuestos orgánicos aromáticos y las sustancias húmicas, como lo son las interacciones π - π entre los anillos aromáticos de ambas sustancias, además de interacciones mediante puentes de hidrógeno [9, 20].

Conociendo que tanto las sustancias húmicas como la materia orgánica disuelta tienen la capacidad de transportar los iones y moléculas de bajo peso molecular en la solución del suelo, y aprovechando las propiedades estimulantes en la raíz de las plantas, estas sustancias son de potencial aplicación para sistemas de dosificación de elementos menores y mayores útiles para la fertilización de los suelos o para la dosificación controlada de sustancias de bajo peso molecular como lo es el ácido naftalenacético el cual es una fitohormona empleada en el enraizamiento de estacas como la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), yuca (*Manihot esculenta*) y rosa (*Rosa sp.*), evitando así la pérdida de estas sustancias por lixiviación, escorrentía o evaporación.

4. Conclusiones

Es posible a través de la metodología descrita concluir que tanto las sustancias húmicas (ácido húmico y ácido fúlvico) como la materia orgánica disuelta del suelo tienen la capacidad de transportar iones y moléculas de bajo peso molecular a través de un medio donde estas sustancias son insolubles e incapaces de difundir por sí mismas; esto es posible debido a las interacciones de coordinación entre los iones metálicos y las sustancias del suelo, los cuales hacen las veces de puente y permiten la interacción de las SH y MOD con aniones tales como el ANA, este compuesto orgánico puede interaccionar con las SH mediante interacciones π - π entre los anillos aromáticos de ambas sustancias.

Agradecimientos

Los autores agradecen a Mindtech S.A.S. y a la Universidad del Valle (MT-004-2016) por los fondos suministrados para la financiación de esta investigación.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflicto de intereses de ningún tipo en relación a la publicación.

Referencias

- [1] Martínez, C.; Bravo, I.; Martín, F. Molecular composition of humic acids evaluated by pyrolysis – gas chromatography – mass spectrometry and thermally assisted hydrolysis and methylation in high Colombian Andean soils. *Revista Colombiana de Química*. (2013) 42, 1-8.
- [2] Canellas, L. et al. Bioactivity and chemical characteristics of humic acids from tropical soils sequence. *Soil Science*. (2008) 173, 624-637.
- [3] Chung, H. et al. Review of Soil Structure Quantification from Soil Images. *Korean Journal of Soil Science and Fertilizer*. (2011) 44, 517-526.
- [4] Nasir, S. et al. Structural elucidation of humic acids extracted from Pakistani lignite using spectroscopic and thermal degradative techniques. *Fuel Processing Technology*. (2011) 92, 983-991.
- [5] Taoualit, N. et al. Extraction and Transport of Humic Acid using Supported Liquid-Membrane Containing Trioctyl Phosphine Oxide (TOPO) as the Carrier. *Acta Physica Polonica*. (2016) 130, 115-121.
- [6] Wershaw, R. Application of a Membrane Model to the Sorptive Interactions of Humic Substances.

- Environmental Health Perspectives. (1989) 83, 191-203.
- [7] Weng, L. et al. Transport of Humic and Fulvic Acids in Relation to Metal Mobility in a Copper-Contaminated Acid Sandy Soil. *Environmental Science & Technology*. (2002) 36, 1699-1704.
- [8] Mass transfer and diffusion. En: Seader J, Henley E. *Separation process principles*. Wiley, Hoboken. (2011) 66-109.
- [9] Overview of membrane separation processes. En: Nath K, *Membrane separation processes*, PHI Learning Pvt. Ltd, Gujarat-India (2017) 1-15.
- [10] Kislik, V. *Liquid membranes: principles and applications in chemical separations and wastewater treatment*. Elsevier. Amsterdam-Paises Bajos (2010) 1-445.
- [11] Jaffrin M., et al. A hydrodynamic comparison between rotating disk and vibratory dynamic filtration systems. *Journal of Membrane Science*. (2004) 242, 155-167.
- [12] Brou A., et al. Dynamic microfiltration of yeast suspensions using rotating disks equipped with vanes. *Journal of Membrane Science*. (2002) 197, 269-282.
- [13] Dalali, N.; Yavarizadeh, H.; Agrawal K. Separation of zinc and cadmium from nickel and cobalt by facilitated transport through bulk liquid membrane using trioctyl methyl ammonium chloride as Carrier. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. (2012) 18, 1001-1005.
- [14] Zhang, W. et al. Kinetic study of chromium (VI) facilitated transport through a bulk liquid membrane using tri-n-butyl phosphate as Carrier. *Chemical Engineering Journal*. (2009) 150, 83-89.
- [15] Senesi, N. et al. Characterization, differentiation, and classification of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Soil science*. (1992) 152, 259-271.
- [16] Fasurova, N.; Pospisilova, L. Characterization of soil humic substances by ultraviolet-visible and synchronous fluorescence spectroscopy. *Journal Central European Agriculture*. (2010) 11, 351-358.
- [17] Konecna, S.; Fasurova, N.; Klucakova, M. Study of humic substances by fluorescence spectroscopy. *Journal of Biochemical Technology*. 82010) 2, s102-s103.
- [18] Artinger R. et al. Characterization of groundwater humic substances: influence of sedimentary organic carbon. *Applied Geochemistry*. (2000) 15, 97-116.
- [19] Valeur, B. *Molecular Fluorescence. Principles and Applications*. Wiley York. (2001). Capítulo 9, 249-251.
- [20] Howell, R.; Gize, A.; Foster, R. The role of fulvic acid in the supergene migration of gold in tropical rain forest soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*. (1993)57, 4179-4 190.