

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS MARINAS



**TÉCNICA POLAROGRAFICA PARA DETERMINAR
FORMALDEHIDO EN AGUA DE MAR.**



TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA

PRESENTA:

LAURA ELENA GOMEZ MORENO

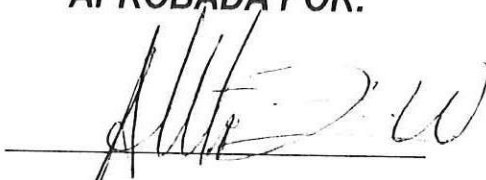
ENSENADA , B.C.

ENERO DE 1998

**TECNICA POLAROGRAFICA
PARA DETERMINAR
FORMALDEHIDO EN AGUA DE MAR**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN OCEANOGRAFIA COSTERA
PRESENTA:
LAURA ELENA GOMEZ MORENO**

APROBADA POR:



**DR ALBERTO R. ZIRINO WEISS
DIRECTOR DE TESIS**



**DR. VINICIO MACIAS ZAMORA
SINODAL**



**MC. RAMON CAJAL MEDRANO
SINODAL**

DEDICADO A:

Mí Dios y Señor Jesús Cristo, que dio su vida para que hoy yo este aquí. Gracias por tu inagotable amor y misericordia.

Mi esposo Raúl, por hacer posible este trabajo. Tu amor, paciencia y comprensión son invaluableles.

Mi Hija Elena Jannet, don glorioso de Dios. Mi pequeña corazón valiente, has llenado mi vida.

Mi Papá, por haberme puesto en el camino y a ti mamá, por ayudarme a concluirlo, tus oraciones fueron escuchadas.

Mi hermana Judith, que siempre estas dispuesta para ayudar. Tu fortaleza y coraje para enfrentar la vida, son una fuente de motivación, por tu apoyo y amor gracias

Mi hermana Araceli, el benjamin de la familia.

Mis hermanos: Jorge, Juan y Pedro, el héroe desconocido.

Mis amados niños: Jonahán, Pedro, Keren y Cesia. Han robado mi corazón.

*Cuán innumerables son tus obras, oh Jehová!
Hiciste todas ellas con sabiduría;
La tierra esta llena de tus beneficios.
He allí el grande y anchuroso mar,
en donde se mueven seres innumerables,
seres pequeños y grandes.
Allí andan las naves;
Allí este leviatán
que hiciste para que jugase en él.
Todos ellos esperan en ti,
para que les des su comida a su tiempo.
Les das, recogen;
Abres tu mano, se sacian de bien.
Escondes tu rostro se turban;
Les quitas el hálito, dejan de ser.
Sea la gloria de Jehová para siempre;
Y alégrese Jehová en sus obras.*

*Salmo 104 :24-31
(La Biblia)*

AGRADECIMIENTOS

A mi director de tesis y maestro Dr Alberto Zirino, por todo tu apoyo, confianza y paciencia al permitirme trabajar contigo.

Al M.C. Ramón Cajal, gracias por todo tu apoyo en el transcurso de mi vida profesional y por tus acertados comentarios al revisar mi trabajo de tesis.

Al Dr. Vinicio Macías, por tus valiosas aportaciones a mi trabajo.

A la M.C. Graciela Guerra, quien siempre ha estado dispuesta a encaminar a un estudiante perdido y por ser mi amiga.

A la M.C. Ana Ma. Iñiguez mi compañera.

A ti René Valdivia, muchas gracias por toda tu ayuda.

A Aída, Laura Dorantes y Amelia Portillo. Jocosas las muchachas.

A mi Maestro Carlos Suárez y su familia, gracias por que siempre podemos contar contigo.

A Jesús Serrano, Irma Soria, Nacho, Arturo Mili, Lorena, Martín y a todos aquellos que de algún modo participaron en la realización de este trabajo.

CONTENIDO

Capítulo		Página
I	INTRODUCCION	1
	Fuentes de formaldehído	1
	Métodos de análisis.	4
1	MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS PARA LA DETERMINACIÓN DE FORMALDEHÍDO	4
2	CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN (HPLC)	5
3	MÉTODOS POLAROGRÁFICOS	5
II	HIPOTESIS	7
III	OBJETIVOS	7
IV	DESARROLLO EXPERIMENTAL	8
1	CONSIDERACIONES	8
1.1	Polarógrafo y técnica empleada	8
1.2	pH	9
1.3	Lavado de material	9
1.4	Reactivos empleados	9
1.5	Preparación de soluciones especiales	10
2	EVALUACIÓN DE INTERFERENCIAS	11
2.1	Pruebas con la técnica de Igmanson (1996)	11
2.2	Cambio de electrolito de soporte a la técnica descrita por Igmanson	11
2.2.1	Concentración óptima de la solución amortiguadora de Girard-T	14
2.3	Adición de un agente quelante	16
2.3.1	Preparación de los blancos con diferentes electrolitos de soporte	16
2.4	Adición de un conservador	19
2.4.1	Preparación de los blancos	19
2.4.2	Preparación del estandar	19
3	PRUEBAS PRELIMINARES EN LA TÉCNICA PROPUESTA	22
3.1	Tiempo de reacción	22
3.2	Cambios en el pH	23
3.3	Interferencias con otros compuestos	26
3.3.1	Grupos carbonilo y carboxilo de bajo peso molecular	26
3.4	Estandar de cinc	30
4	APLICACIÓN DE LA TÉCNICA MODIFICADA	31
4.1	Curvas de calibración en NaCl 0.5 M y agua de mar radiada con UV, Consumo de solución AG-T	31
4.2	Aplicación de la técnica polarografica en muestras de agua de mar	40
4.3	Perfil de HCHO en el Golfo de California	41
4.3.1	Coprecipitación	42

INDICE DE TABLAS

Tabla		Pagina
I	Métodos espectrofotométricos más comunes hasta 1970	4
II	Resultados observados cuando se cambia el valor de pH en los blancos con NaCl 0.5M como electrolito de soporte y utilizando la técnica modificada de PPD para determinar HCHO utilizando AG-T.	24
III	Resultados mostrados en los polarogramas para cada compuestos con grupo carbonilo o cinc	27
IV	Curva de adición de Zn^{+} , en agua de mar UV	30
V	Resultados de los polarogramas utilizando PPD en diferentes muestras de agua de mar	41
VI	Resultados de la técnica de coprecipitación de HCHO en agua de mar a diferentes profundidades	45

INDICE DE FIGURAS

Figura		Pagina
1	Fuentes principales de formaldehído al océano.	3
2	Mecanismo de reacción de Girard-T con el grupo carbonilo	6
3	Resultados obtenidos experimentalmente aplicando la técnica de Igmanson. Regresión lineal e histograma de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) del HCHO	12
4	Polarogramas típicos de obtenidos experimentalmente con la técnica de de PPD desarrollada por Igmanson, para un blanco y un estandar de 8 μ M de HCHO utilizando agua de mar sintética como electrolito de soporte	13
5	Curvas de adición de solución amortiguadora de G-T en dos diferentes electrolitos de soporte a pH 5	15
6	Series de tiempo que muestran la estabilidad de la corriente del blanco a pH 5 con respecto al tiempo, utilizando 0.5 ml de AG-T	18
7	Efecto de la adición de mercurio como conservador en el blanco y en el estandar de HCHO 4 μ M con respecto al tiempo	20
8	Tiempo de reacción y estabilidad del G-T con 4 μ M de HCHO	23
9	Polarogramas de los blancos a diferentes valores de pH (4,5 y 6), utilizando NaCl al 0.5 M como electrolito de soporte	25
10	Polarogramas de referencia para comparar los valores obtenidos por la adición de carbonilos de bajo peso molecular a una misma muestra, para conocer las interferencias y los $E_{1/2}$ representativos	28
11	Polarogramas de referencia para comparar los valores obtenidos por la adición de carbonilos de bajo peso molecular y una concentración de 10 μ M	29
12	Regresión lineal de HCHO en NaCl al 0.5M con 0.5 ml de solución AG-T y consumo de la solución AG-T	32
13	Polarograma de 10 μ M de HCHO en NaCl 0.5 M, con un potencial de barrido de -0.8 a -1.8V	33

Figura		Pagina
14	Regresión lineal de HCHO en agua de mar UV, a pH 5 y 0.5 ml de sol. amortiguadora de G-T.	36
15	Polarogramas de 10 μ M de HCHO en agua de mar UV	37
16	Histogramas de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de HCHO, utilizando 0.5 ml de solución amortiguadora de G-T, en dos diferentes electrolitos de soporte tratados con chelex-100	38
17	Histogramas de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de AG-T, en dos diferentes electrolitos de soporte tratados con chelex-100	39
18	Variación de la concentración de oxígeno disuelto y HCHO con la profundidad en el Golfo de California, México	43
19	Polarogramas aplicando la técnica de coprecipitación en agua de mar, para concentrar el HCHO, perteneciente al Golfo de California a una profundidad de 600 m. Precipitado y sobrenadante	44
20	Agua de mar envejecida con AG-T y tratada con Chelex-100, utilizada para la coprecipitación y redisolución para concentrar la muestra. Concentración inicial de HCHO y con 2 μ M de HCHO	46
21	Polarogramas del precipitado y sobrenadante de la solución patrón de 2 μ M de HCHO en agua de mar envejecida.	47

RESUMEN

Se modificó la técnica polarográfica de pulso diferencial para detectar formaldehído en agua de mar descrita por Igmanson (1997), empleando el reactivo de Girar-T para derivatizar. El límite de detección encontrado al modificar la técnica fue de $0.66 \mu\text{M}$ de HCHO empleando agua de mar irradiada con luz UV como blanco; y de $0.06 \mu\text{M}$ de HCHO si se emplea una coprecipitación y redisolución de carbonatos de calcio y magnesio, con una recuperación mayor del 80%. La selectividad de la técnica implementada fue buena (nivel de confianza al 95%) con respecto a diversos aldehídos de bajo peso molecular, la acetona y el ácido acético. Se probó la técnica en muestras de agua provenientes de una zona costera impactada por asentamientos humanos, encontrando concentraciones que van de 2 a $5 \mu\text{M}$ de formol. Así mismo, se obtuvo un perfil vertical en aguas del Golfo de California, México. Los valores máximos de concentración se encontraron en la superficie ($1.8 \mu\text{M}$) y en la zona cercana al mínimo de oxígeno ($1.9 \mu\text{M}$).

I INTRODUCCIÓN

La materia orgánica disuelta (MOD), es el reservorio de carbón reducido más grande en el océano (Benner *et al* 1992), forma grandes agregados muy estables y complejos, con una gran cantidad de grupos funcionales. Su producción es regida principalmente por: Productos metabólicos de excreción, ruptura celular, muerte y descomposición de organismos. Como es de suponerse la concentración de la MOD va a depender de la localización geográfica y la época del año. Sin embargo, la podemos clasificar en dos grandes grupos: a) Material húmico y polimérico de difícil degradación (~75%), que tienen grandes tiempos de residencia; y b) aminoácidos, proteínas, lípidos, carbohidratos, carbonilos y carbón elemental (~25%), que presentan gran variabilidad en cortos periodos de tiempo. (Liebezeit y Dawson, 1982; Azam y Amernan, 1984; Ziechman, 1988; Bayona, *et al* 1989; Buffle, 1990; y Xiangliang and Mopper 1997).

Actualmente se tiende a particularizar el problema de la complejidad de la MOD, ya que es muy difícil tener reproducibilidad en los experimentos. La tendencia nos lleva al estudio de la especiación química de los compuestos, que determina la existencia de determinados grupos funcionales y al desarrollo de nuevas técnicas (Ziechman , 1988). En este campo se tiene que la mayoría de las interpretaciones no siguen el análisis clásico de las estructuras usando los métodos de la química orgánica, sino que se aproximan a la realidad de acuerdo a las observaciones experimentales (Buffle, 1990).

Fuentes de formaldehído (HCHO)

El formaldehído (HCHO), como parte de los compuestos carbonilo de bajo peso molecular que se encuentra en abundancia en la MOD, se distribuye ampliamente en el medio ambiente marino, desde las zonas costeras hasta el mar abierto a través de toda la columna de agua (fig. 1); este pueden ser producido, asimilado y transformado por diferentes microorganismos (Smyth, 1979; Carlson 1983; Eberhardt y Sieburth 1985; Mopper y Stahovec, 1986; Bayona *et al* 1988 ; Buffle 1990, Kimoto y Fujinaga, 1990; y Lambert *et al* 1992).

Uno de los principales aportes de HCHO en la zona fótica es la fototransformación de la MOD en la interfase océano-atmósfera (0.020-0.171 μM), donde llega a presentar una razón de 25:1 de toda la producción de HCHO en la columna de agua (0.002-0.024 μM) (Zafirov *et al* , 1980; Mopper y Stahovec, 1986; Kieber *et al* 1989 y Xiangliang y Mopper 1997).

Por otro lado el flujo y la concentración de los HCHO, desde la microcapa hacia la columna de agua, depende de la asimilación biológica, mezcla turbulenta y difusión (Kieber y Mopper, 1990). Se ha encontrado, que en zonas con bajo contenido de oxígeno la concentración de HCHO es alta (0.6-8.8 μM) debido a la oxidación bacteriana de los compuestos metilados de la MOD (Smyth 1979; y Eberhardt y Sieburth 1985).

El HCHO es considerado un compuesto tóxico a altas concentraciones y aunque su uso esta regulado, el aporte antropogénico al océano vía atmósfera y a las zonas costeras por descargas de aguas residuales llega a ser considerable, debido a su amplio uso como aditivo en muchas reacciones químicas, tanto a nivel industrial (elaboración de plásticos, pegamentos, solventes, utilización de cortinas de agua, etc.); biomédico (investigación, preservativo, etc.); y domestico (catalizador en muchos compuestos utilizados en los hogares tales como: selladores, pinturas, etc.) (Dekker 1983). Además de ser producido como un metabolito en las aguas de desecho debido a la descomposición de materia orgánica (Wheeler, 1968; Smyth, 1979; y Metcalf-Eddy, 1994)

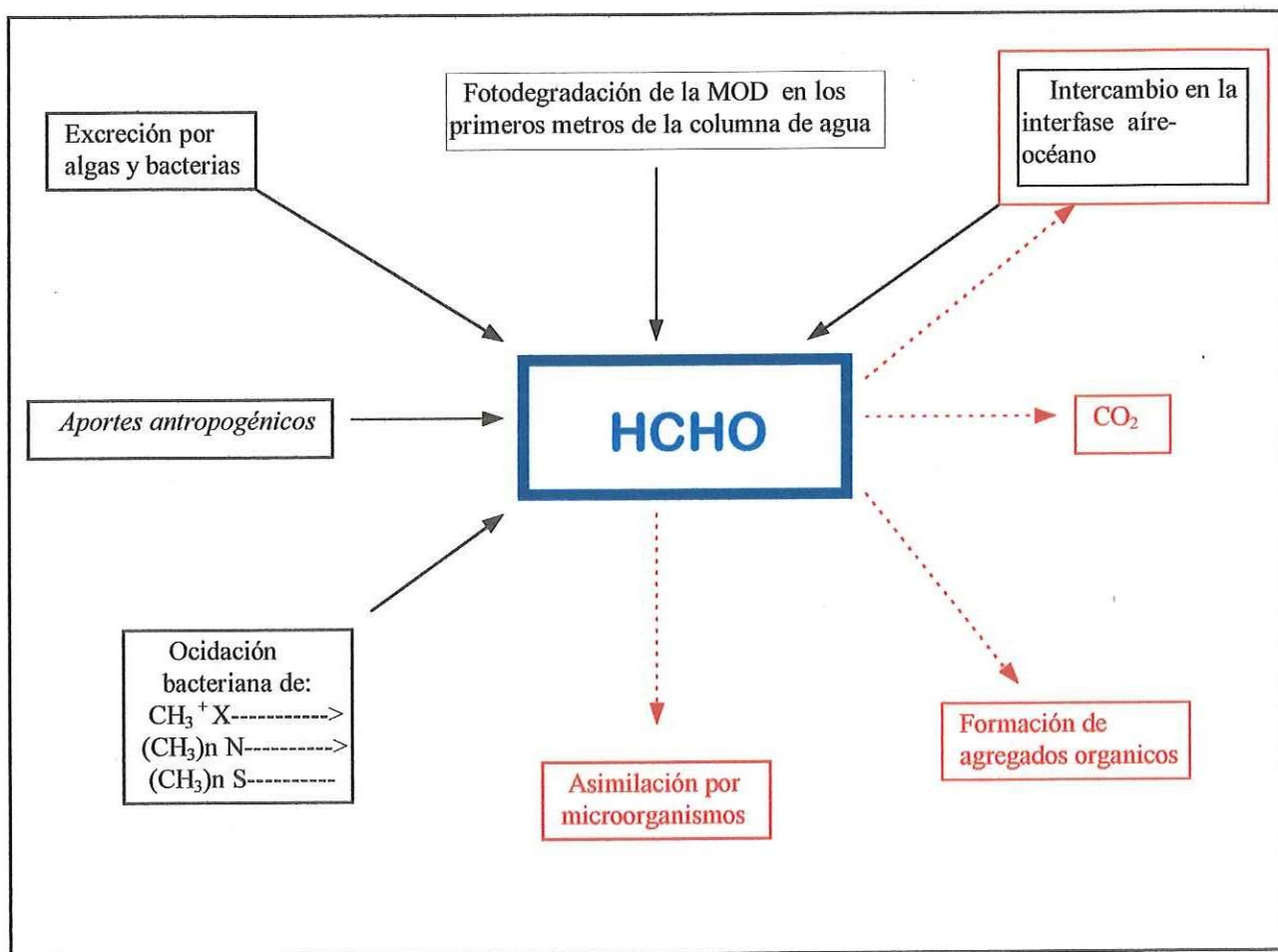


Figura 1 Fuentes principales de formaldehído al océano. Producción, transformación y asimilación.

Métodos de análisis

Se han implementado varias técnicas de laboratorio para el análisis de HCHO en el agua de mar, sin embargo, debido a su volatilidad, la asimilación biológica y a que tiende a formar agregados orgánicos con otros compuestos, aunado a las interferencias con diversos compuestos presentes en el agua de mar, ha sido muy difícil la aceptación generalizada de una técnica estándar.

1 Métodos espectrofotométricos para la determinación de formaldehído

Los siguientes métodos enlistados en la tabla I habían sido los más empleados hasta 1970, pero debido a las interferencias que presentaban y a su falta de especificidad entraron en desuso. Solo el método del 3-metil-benzotiazolinona-hidroclorica (MBTH), adaptado por Eberhardt y Sieburth en 1985 de las técnicas de Sawiski *et. al.* (1961) y Pays *et-al* (1966, citado por Eberhardt y Sieburth, 1985), para su uso en cultivos cerrados de bacterias metiltróficas, con un límite de detección de 0.18 μM en celdas de 1 cm, se utilizó por varios años. El MBTH presenta entre otras cosas interferencias con aldehídos alifáticos solubles en agua, aminas aromáticas y compuestos heterocíclicos imino tendiendo a sobrestimar los valores encontrados de HCHO (Sawiki *et. al.*, 1963; Chevrolot, 1991; y Gómez-Moreno *et. al.* 1997).

Tabla I Métodos espectrofotométricos más comunes hasta 1970.

Reactivo	Límite de detección	Desventajas
Ac. cromotrópico Altshuller <i>et al.</i> 1961	> 1.0 μM	Reacciona con compuestos derivados del HCHO y con azúcares en aguas naturales
J-ácido Sawikie <i>et.al.</i> 1963	3.3 μM	No es específico para formol
Fluorométrico Belman, 1963	0.2 μM	La respuesta de los estándares no es lineal en el intervalo de medición.
MBTH Pays <i>et. al.</i> 1966	0.8 μM	Reacciona con aldehídos alifáticos y aromáticos,

2 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)

Como una alternativa a los métodos espectrofotométricos se implementa la técnica cromatográfica con derivados de la 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), para la determinación de aldehídos en agua de mar (Mopper y Stahovec, 1986; Kieber y Mopper, 1990; y Zhou y Mopper, 1997). Esta técnica permite la detección de 0.5 nM para aldehídos y 5 nM para cetonas con detectores de absorbancia en la región UV-visible (detectores de arreglo de diodos). Estos límites de detección se alcanzan con el método directo, pero se puede aumentar un orden de magnitud, concentrando la muestra en columna de Sep-Pak C-18 y eluyendo con acetonitrilo al 10 %. A pesar de que este método cromatográfico tiene una alta sensibilidad y selectividad se requiere de equipo costoso.

3 Métodos polarográficos

Otra opción en la determinación de HCHO en aguas naturales son los métodos polarográficos utilizando el reactivo de Girad-T (cloruro de carboximetil-trimetilamonio-hidrazina $C_5H_{14}N_3OCl$) para derivatizar. Igmanson (1997) modifica la técnica descrita en el NIOSH de polarografía de pulso diferencial (PPD) para medir formaldehído en el aire (técnica 3501 del Manual of Analytical Methods. US Department of Health and Human Services; Eller, 1984) y la aplica en mediciones directas en agua de mar, con un límite de detección de 100 nM; sin embargo sólo puede detectar HCHO en aguas hidrotermales. Por otro lado el Girad-T también ha sido utilizado con voltametría de adsorción para la medición de HCHO en agua dulce obteniendo un límite de detección de 80 nM (Hong Chan y Yao Xie, 1997). Estos límites de detección, hacen de la polarografía una opción para las técnicas cromatográficas, con la ventaja de la velocidad de análisis y su bajo costo. Este trabajo pretende modificar la técnica descrita por Igmanson (1997) para la detección de HCHO en agua de mar y aumentar la sensibilidad de la técnica.

La utilización del Girad-T para derivatizar el HCHO y su detección con un método polarográfico, se fundamenta primeramente en la especificidad del reactivo de Girad-T con el grupo carbonilo y en segundo lugar en que el Girad-T al reaccionar con el grupo

carbonilo produce carbazonas que son eléctricamente activas (fig. 2). Dependiendo del tipo de producto generado por la reacción, se puede suponer que el potencial de media onda ($E_{1/2}$), bajo ciertas condiciones es específico para cada aldehído y cetona, con lo cual se puede conocer de forma sensitiva y selectiva discriminante, el tipo de compuesto carbonilo presente en una muestra de agua de mar.

a) *Hydrogenación del grupo carbonilo*

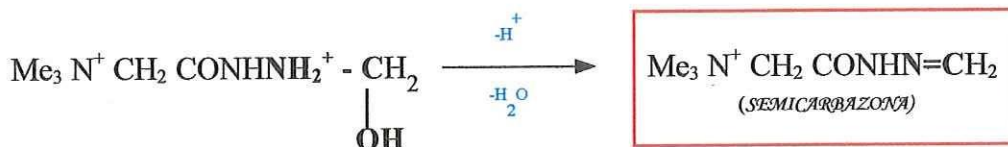
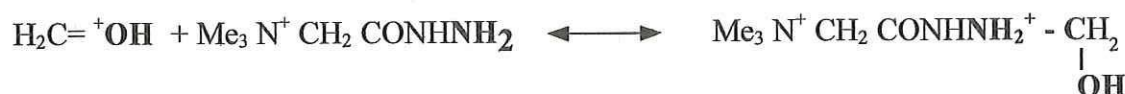
Reacciones intermedias



Formaldehído



Girad-T



b) *Reacciones de transferencia de electrones*



Figura 2 Mecanismo de reacción del Girad-T con el grupo carbonilo. La aplicabilidad de la técnica esta en función de la hidrogenación del grupo carbonilo para producir semicarbazona o hidrazona; mientras que la velocidad de reacción depende de que la concentración del carbonil + H^+ sea elevada, y la concentración de la amina + H^+ sea baja. E_1 y E_2 son los dos potenciales de la curva para propósitos analíticos (Smyth 1979). Me_3 = tres grupos metilo.

II HIPÓTESIS

Con base en el potencial de media onda que bajo ciertas condiciones de laboratorio es específico para cada sustancia y a la especificidad del Girad-T para hacer eléctricamente activos los compuestos carbonilo se estima que se pueden identificar y cuantificar al formaldehído presente de forma natural o por contaminación antropogénica en el agua de mar utilizando polarografía de pulso diferencia (PPD).

III OBJETIVOS

Adecuar la técnica de PPD para formaldehído descrita por Igmanson (1996), para su aplicación en agua de mar.

Comparar los resultados obtenidos con HCHO con acetaldehído, butaraldehído, benzaldehído, acetona y ácido acético (para identificar interferencias con algunos carbonilos o carboxilos de bajo peso molecular, ya reportados en el agua de mar) con el potencial de media onda obtenido para HCHO.

Aplicar la técnica implementada a diferentes muestras de agua de mar, con la finalidad de evaluar concentraciones de estos compuestos en aguas residuales y zonas costeras.

IV DESARROLLO EXPERIMENTAL

1 Consideraciones

1.1 Polarógrafo y técnica empleada

Durante todos los experimentos se utilizó un polarógrafo, marca Sargent Welch modelo 7001, empleando una celda voltamétrica de 30 ml, constituida por un microelectrodo auxiliar de platino, un microelectrodo de referencia de Ag^+/AgCl y un electrodo de trabajo de goteo continuo de mercurio (DME), las condiciones experimentales para la polarografía de pulso diferencial (PPD) fueron: Potencial inicial $E_0 = -0.6 \text{ V}$, potencial final $E_f = -1.2 \text{ V}$, velocidad del barrido 5 mV s^{-1} , amplitud del pulso 50 mV , tiempo de purga 8 min , tiempo de equilibrio 30 s y velocidad de goteo 1 s . Sólo cuando se indique en el experimento se modificaron estas condiciones.

PPD

La polarografía es una técnica electroquímica en la que se aplica un potencial eléctrico (intervalo preciso de voltaje), proveniente de una fuente externa, a una celda cerrada, de volumen conocido, donde se encuentra la muestra. Al aplicar el voltaje medimos el flujo con que la corriente pasa en la celda. Bajo condiciones controladas este flujo de electrones nos dice la concentración de las especies que están siendo oxidadas o reducidas.

Dentro de las técnicas polarográficas la PPD se fundamenta en fijar la amplitud del pulso (volts) que va a recibir de forma secuencial cada gota de mercurio. Un pulso es aplicado al final de la vida de la gota y otro al inicio de la siguiente vida de la gota de mercurio (antes de que se aplique el nuevo pulso). Ahora bien al primer valor de corriente así obtenido, el instrumento de forma automática le sustrae el segundo valor y la diferencia es almacenada en la memoria del instrumento o graficada. Bajo estas condiciones, si la especie no se oxida o reduce, la diferencia existente en la corriente se mantiene constante de gota a gota, dando como resultado una línea horizontal en el polarograma (gráfica de voltaje contra corriente). Cuando el barrido de potencial entra en la zona donde la oxidación-reducción se lleva a cabo, esta diferencia en corriente empieza a cambiar; la

velocidad con que cambia hasta llegar al "pico", es el punto de equivalencia del potencial de media onda . La amplitud y anchura de la onda así obtenida esta en función de la amplitud del pulso aplicado al barrido de corriente directa. (Vassos y Galen, 1987; y Sargent-Welch manual del polarógrafo modelo 7001)

1.2 pH

A todas las muestras se ajusto el pH a 5 con HCl al 0.5 N y NaOH al 0.5 N. La medición de pH se realizó utilizando un potenciómetro marca orion 720 con un electrodo de pH de combinación Orion- Roos. Para cada experimento se calibró el potenciómetro y se obtuvo el valor de la pendiente con soluciones amortiguadoras propuestas por Dixon (1993). El pH se midió en mv y se transformó a unidades de pH. El intervalo de variación de pH que se permitió en las muestras fue de ± 0.1 unidades de pH (sólo cuando se indique en el experimento se modificó el pH).

1.3 Lavado de material

- a) Todo el material de cristalería fue sumergido en HCl al 10% durante 24 horas, posteriormente se lavaba con agua corriente y enjuagaba con agua destilada, agua desionizada y agua desionizada y tratada con CHELEX-100. El material así lavado, era secado al ambiente y almacenado. Todos los recipientes de vidrio eran tapados con parafilm.
- b) Para la limpieza de los electrodos y la celda de trabajo se enjuagó con agua destilada, después agua desionizada y posteriormente con agua desionizada tratada con CHELEX-100. Cuando se terminaba de correr una curva de calibración o se cambiaba de electrolito de soporte, se empleaba la misma técnica de lavado descrita en a), pero sin emplear agua corriente y con un tiempo más corto (15 min) de lavado con HCl al 10%.

1.4 Reactivos empleados.

Ac. clorhídrico grado reactivo, cloruro de sodio grado reactivo, hidróxido de sodio grado reactivo, Chelex-100, Formol al 33% grado reactivo, Girad- T, Tritón-X, Fosfato dibásico de sodio grado, ác. cítrico, nitrato de mercurio, nitrato de cinc. acetona grado HPLC, ác.

acético grado reactivo, acetaldehído, butaraldehído y benzaldehído sulfato de cobre, carbonato de calcio, carbonato de magnesio, agua desionizada calidad 18 megaohms, agua de mar envejecida y filtrada por filtros gelman A/E previamente combustiónados a 500° C por 1 h, solución de KCl saturada para llenado de electrodos de referencia marca ORION, nitrógeno grado ultra puro marca praxair.

1.5 Preparación de soluciones especiales

a) Agua desionizada tratada con CHELEX -100.

Primeramente el CHELEX-100 era activado con HCl al 10 % y con agitación constante durante 1 hora, posteriormente se lavaba con agua desionizada hasta un pH de 6.5 - 7. El CHELEX-100 limpio era adicionado al agua desionizada (0.2 gr /4 L) y se mantenía en agitación durante 1 hora, se dejaba sedimentar. El sobrenadante era almacenado en recipientes de vidrio limpios y el CHELEX-100 era nuevamente utilizado.

b) Solución de Chelex-100

0.2 gr de Chelex-100 ya activado, era almacenado en botellas de 100 ml con agua desionizada para ser añadido a los estándares cuando se requiriera.

c) Solución amortiguadora de Girad-T (AG-T)

La solución amortiguadora fue preparada fresca para cada experimento de la siguiente manera: 1.33 gr de fosfato dibásico de sodio, 1.08 gr de ác. cítrico, 0.393 gr de Girad-T y 0.66 ml de Tritón-X al 2% en 100 ml de agua desionizada y tratada con CHELEX 100.

d) Agua de mar sintética

Para 1L de agua se requiere: 23.934 gr de cloruro de sodio, 5.079 gr de sulfato de magnesio, 3.994 gr de sulfato de sodio, 1.123 gr de cloruro de calcio, 0.660 gr de cloruro de potasio y 0.196 gr de carbonato de sodio. y se afora con agua desionizada.

e) Agua de mar irradiada con luz UV

La cual fue, proporcionada por NOSC San Diego, Ca, EUA, con un pH final de 8. Esta agua fue colectada enfrente del muelle de SCRIPPS en San Diego, Calif., USA y no se filtró antes de ser irradiada con luz UV durante 6 h. La técnica se aplicó para la oxidación de la materia orgánica fue de acuerdo a Armstrong, *et. al.* (1966)

2 Evaluación de interferencias

2.1 Pruebas con la técnica de Igmanson (1997)

Con la finalidad de calibrar los instrumentos de trabajo y evaluar las condiciones de laboratorio óptimas para la determinación de HCHO, se llevaron a cabo pruebas de laboratorio previas al análisis de muestras en el agua de mar. Los reactivos y la metodología que se siguieron en estas pruebas fueron de acuerdo a la técnica de PPD descrita por Igmanson (1997) para detectar formaldehído en agua de mar. Se realizaron varias curvas de calibración a pH 5 trabajando por duplicado. Los estándares se prepararon en el intervalo de 0 a 10 μM de HCHO utilizando agua de mar sintética como electrolito de soporte. El mejor límite de detección alcanzado al aplicar la técnica de Igmanson fue de 2.02 μM de formol y una r^2 de 0.89. Los resultados de las curvas de calibración se muestran en la figura 3 y un polarograma típico en la figura 4.

La regresión lineal aplicando la técnica de Igmanson que utiliza agua de mar sintética como electrolito de soporte, presenta una gran dispersión de los datos alrededor de la recta promedio a concentraciones bajas de HCHO (fig. 3a). Mientras que $E_{1/2}$ tiene una tendencia con la moda -0.967 V con el 52 % de los datos, el promedio se encuentra a -0.962 V con un 13 % de los datos. La diferencia entre la moda y el promedio nos genera una asimetría marcada a la izquierda y que los valores de $E_{1/2}$ no tengan un comportamiento normal; sin embargo el coeficiente de variación es pequeño (0.68 %), al igual que su desviación estándar (± 0.007 V, fig. 3b).

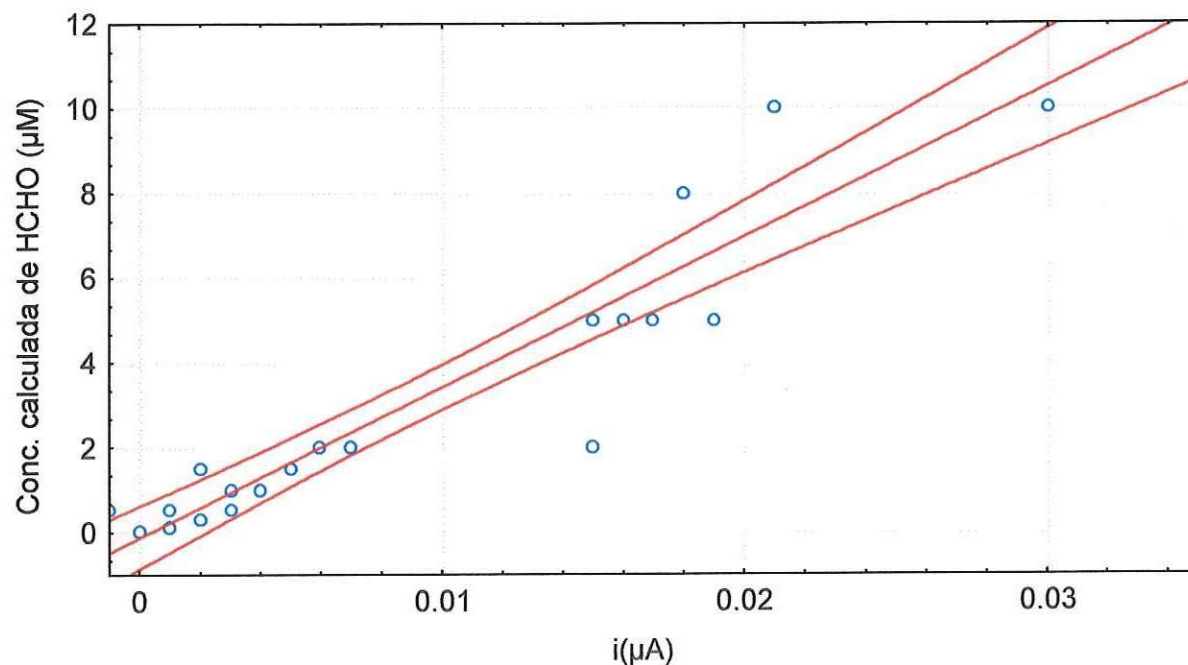
Debido a que no se pudo alcanzar el límite de detección reportado por Igmanson (0.1 μM) aunado a que el valor del blanco fue muy alto (en promedio 0.033 μA , fig. 4), fue necesario hacer una revisión de las condiciones del método.

2.2 Cambio de electrolito de soporte a la técnica descrita por Igmanson

Para cada uno de los experimentos que se describen en esta sección se empleó NaCl 0.5 M para la evaluación de las interferencias debidas a la pureza de los reactivos utilizados en el agua de mar sintética, también se usó agua de mar pasada por luz UV para comparar la posibilidad de que el Girard-T (G-T) reaccione con otros iones presentes en

a) Regresión lineal de HCHO empleando la técnica de Igmanson

$$Y = 306.02 \cdot X + 0.55518; r = 0.90; LD = 2.02 \mu M$$



b) Histograma de $E_{1/2}$ para HCHO utilizando agua de mar sintética

$$n = 31; x = -0.96 V; STD = 0.007 V$$

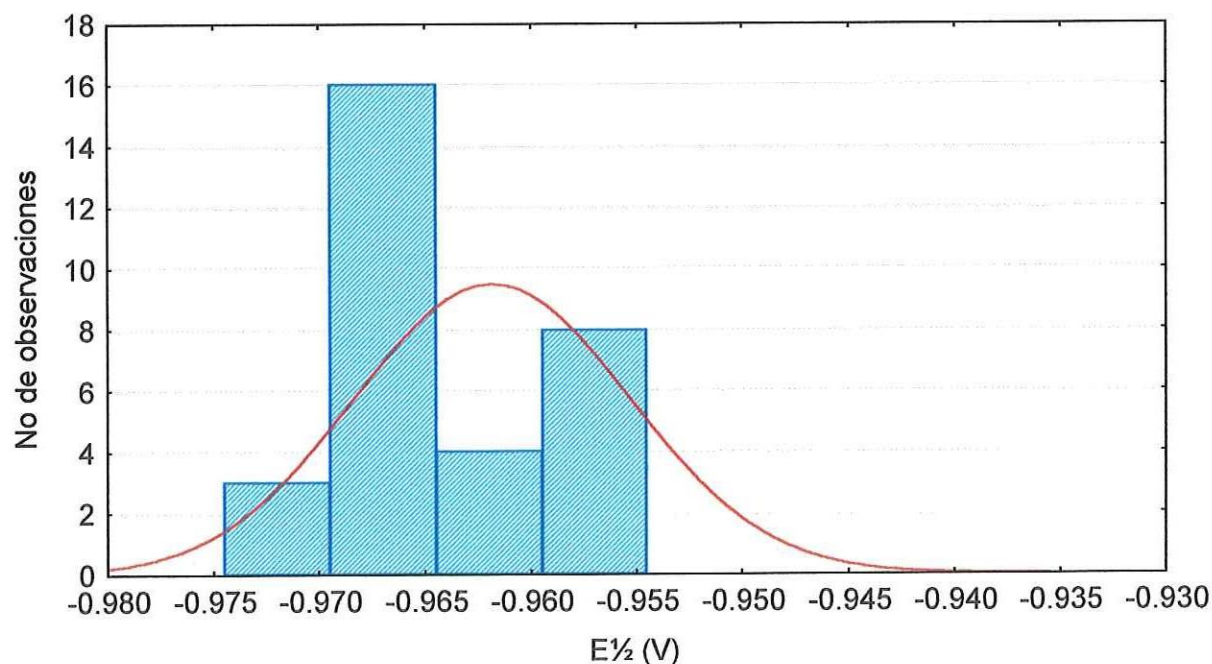


Figura 3 Resultados obtenidos experimentalmente aplicando la técnica de Igmanson. Regresión lineal (a) e histograma de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) del HCHO (b). Donde Y = ecuación de la recta, $r=r^2$, i =corriente, LD= límite de detección, n =número de datos, x = promedio de $E_{1/2}$, y STD=desviación estandar de $E_{1/2}$.

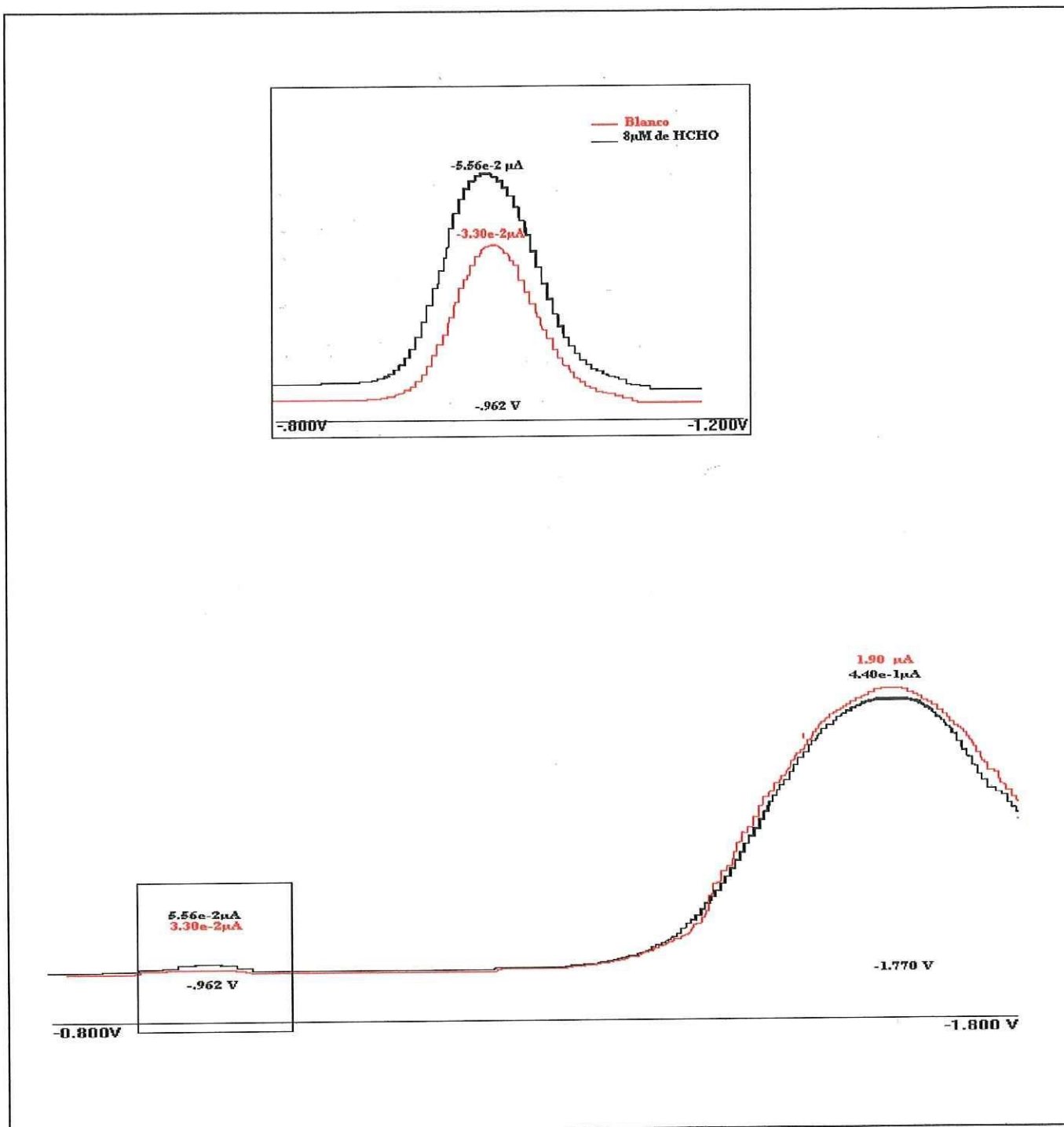


Figura 4 Polarogramas típicos de obtenidos experimentalmente con la técnica de PPD desarrollada por Igmanson, para un blanco y un estandar de 8 μ M de HCHO utilizando agua de mar sintética como electrolito de soporte. El recuadro superior izquierdo es la ampliación de la curva detectada por el aparato, pero debido a la corriente obtenida por el G-T a un potencial de -1.770 V no permite apreciarlos.

el agua de mar y finalmente, agua de mar envejecida como punto de referencia para condiciones naturales, donde intervienen compuestos orgánicos además de los constituyentes mayores del agua de mar.

2.2.1 Concentración óptima de solución amortiguadora de Girad-T (AG-T)

Se realizó una curva de calibración con adición de AG-T en un intervalo de 0 a 1 ml (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5. y 1.0 ml). Los estándares se realizaron por duplicado con 3 réplicas, para cada electrolito de soporte a pH 5. Se hizo el barrido de potencial desde $V_o = -0.8$ V a $V_f = -1.8$ V con PPD de acuerdo a las condiciones ya establecidas en el apartado IV.1.1. Los resultados de corriente se graficaron contra la adición de solución amortiguadora para cada señal de corriente identificada y para cada electrolito de soporte (figura 5). En la figura 5a se observa que la corriente producida por la reducción del G-T aumenta conforme aumenta la adición de solución amortiguadora. Este efecto es más pronunciado en el electrolito de cloruro de sodio; mientras que en el agua de mar pasada por UV (al igual que en el agua de mar envejecida) la corriente tiende a estabilizarse a partir de los 0.5 ml de solución amortiguadora de G-T, con una corriente promedio de $0.9 \mu\text{A}$. Este hecho tal vez se deba a que la concentración de AG-T promueve la reacción con algún agente ligante inorgánico, produciendo un aparente consumo de G-T, que se manifiesta en una corriente menor en el agua de mar pasada por UV a la observada en la solución de cloruro de sodio.

En la figura 5b se muestra el comportamiento de la corriente producida en el potencial de media onda del HCHO-GT contra la adición de solución AG-T. Es interesante notar que existe una corriente promedio medible (0.008 a $0.012 \mu\text{A}$), aún cuando no se ha adicionado solución AG-T, lo cual sugiere la presencia de cinc en ambos electrolitos, ya que su $E_{1/2}$ (-0.900 V v.s. Ag/AgCl) es muy similar al del HCHO-GT. Por ello, la corriente es mayor en el agua de mar en este punto. Posteriormente, conforme se adiciona AG-T la corriente aumenta llegando a un valor máximo promedio de 0.27 y $0.22 \mu\text{A}$ para el NaCl y el agua de mar pasada por UV, respectivamente. Otro, aspecto importante de notar, es la similitud del comportamiento de la corriente en ambos electrolitos, teniendo valores más altos en el NaCl.

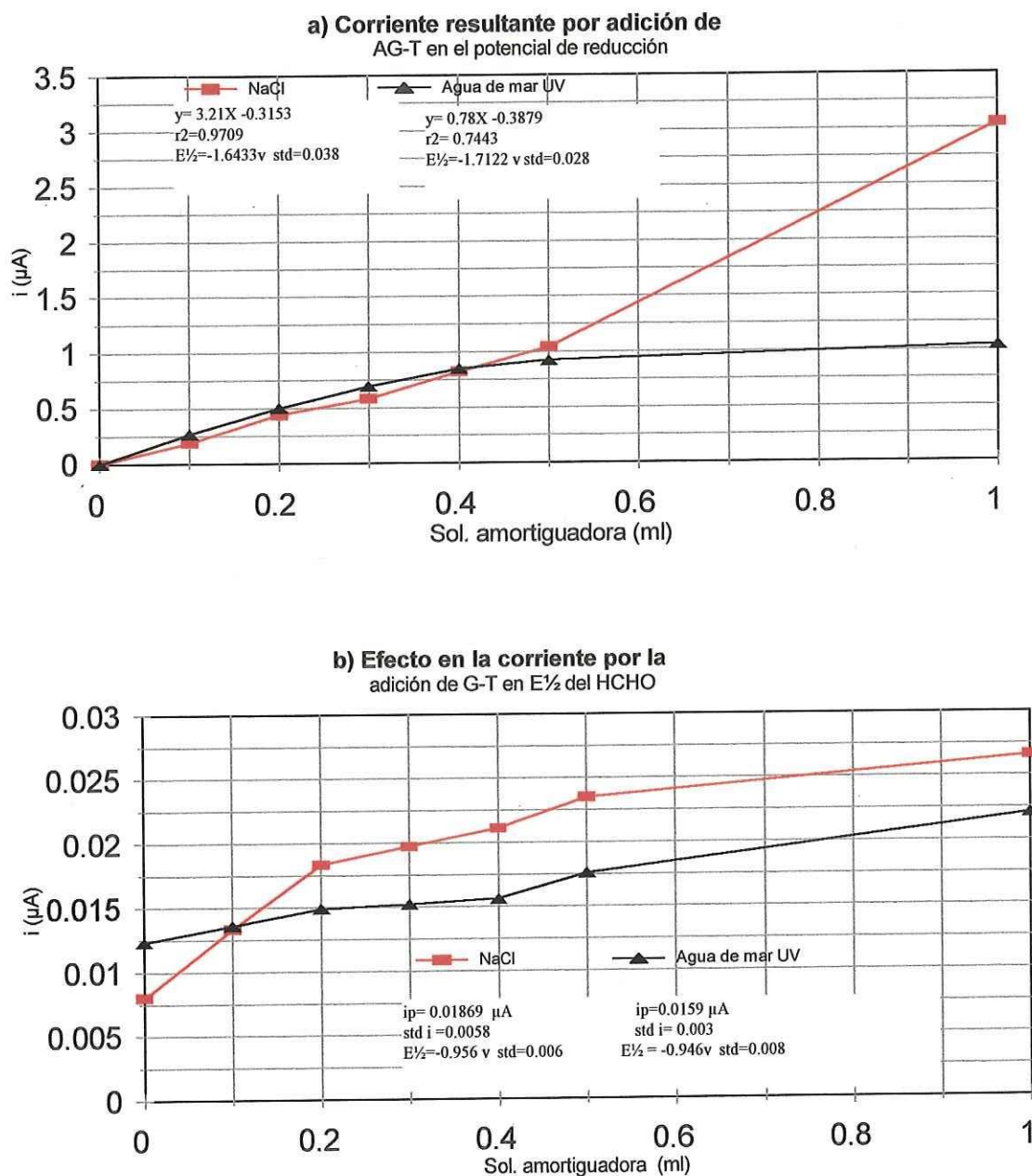


Figura 5 Curvas de adición de solución amortiguadora de G-T en dos diferentes electrolitos a pH 5. Aumento de la corriente (i) por la reducción del G-T al potencial de onda media ($E_{1/2}$) característico (a) y efecto en la " i " a la $E_{1/2}$ donde ocurre la reducción del HCHO por la adición del AG-T (b). Donde: p = promedio, y STD = desviación estandar de $E_{1/2}$. Debe notarse que la escala del eje " y ", en la gráfica (a) está aumentado en dos ordenes de magnitud.

Además, se observa que la corriente se mantiene estable en un intervalo de 0.2 a 0.4 ml de solución AG-T

2.3 Adición de un agente quelante

Del apartado anterior se tomaron las siguientes condiciones: utilizar 0.5 ml de solución de AG-T por cada 20 ml de muestra, buscar un agente quelante para eliminar la posible señal de cinc que interfiere con la determinación de HCHO y observar el comportamiento de las muestras con respecto al tiempo comparando los cambios en la corriente de las muestras tratadas con quelantes y sin tratar.

Se debe considerar que las concentraciones naturales de cinc en el agua de mar se encuentran en el orden de 10^{-8} a 10^{-9} M aprox., pero en ocasiones es posible encontrar concentraciones detectables con PPD (10^{-6} a 10^{-7} M) debidas a contaminación.

Para eliminar la posible presencia de cinc, en este análisis, se utilizan dos tipos de quelantes:

- a) Solución de Chelex-100 de la cual se añadía 1.5 ml de suspensión por cada 248.5 ml del blanco, se agitaba por 20 min. y se dejaba sedimentar la muestra por 30 min. antes de empezar el análisis. Durante la toma de muestras se evitó perturbar el sedimento.
- b) Añadir por cada 245 ml de blanco, 5 ml de EDTA al 0.005 M, para tener una concentración final de 1×10^{-4} M de EDTA en solución.

2.3.1 Preparación de los blancos con diferentes electrolitos de soporte

La preparación de los blancos se siguió con la siguiente metodología: Los electrolitos de NaCl 0.5 M, agua de mar UV y agua de mar envejecida, se transfirieron a matraces volumétricos de 250 ml, por duplicado; a cada uno se añadió 6.25 ml de solución AG-T y se aforó a 250 ml con cada electrolito respectivo (excepto cuando se utilizan quelantes incisos (a) y (b) arriba citados), posteriormente se ajustó el pH a 5. Una vez preparados los blancos se realizó el barrido de potencial de acuerdo a las condiciones establecidas previamente (apartado IV.1.1). Durante los análisis se tomaron alícuotas de 20 ml por duplicado para cada blanco (con EDTA, Chelex-100 y sin quelante). Los

resultados se muestran en la figura 6 donde se grafica corriente obtenida de la reducción del complejo HCHO- GT contra el tiempo. La reducción del complejo de HCHO-GT se lleva a cabo a un potencial de media onda de -0.946 V , en promedio.

En la figura 6a, se observa que inicialmente la corriente de los blancos es igual para ambos casos, sin embargo al paso del tiempo se tiene un aumento rápido de la corriente en el agua de mar UV estabilizándose después de las 24 h, en un intervalo de 0.06 a $0.07\text{ }\mu\text{A}$ (este comportamiento es igual para el agua de mar envejecida (no mostrada) pero se mantiene en el intervalo de 0.07 a $0.08\text{ }\mu\text{A}$); en cambio cuando se utiliza el NaCl 0.5 M como electrolito de soporte, se observa que la pendiente no es tan pronunciada como en el caso del agua de mar, aunque tarda más en estabilizarse (aprox. 72 h) en un intervalo menor de 0.04 a $0.05\text{ }\mu\text{A}$. En este punto es importante mencionar que al paso del tiempo todas las muestras empezaron a presentar agregados bacterianos (blanquecinos de tamaño variable) debido a la temperatura ambiente ($30\text{ }^{\circ}\text{C}$ aprox.) a las 72 h. Después de las 120 h no era posible tener reproducibilidad entre duplicados y la corriente era muy errática entre réplicas, debido a que los agregados bacterianos se adherían al electrodo de referencia.

Cuando se emplean quelantes (figuras 6b y 6c), se observa una corriente menor cuando se emplea Chelex-100 que EDTA, aunque en el mismo intervalo (~ 0.02 a $0.03\text{ }\mu\text{A}$), el problema se presenta a las 72 h donde el agua de mar tratada con EDTA aumenta su valor de corriente; este aumento no se observa para el caso del CHELEX-100, que se sigue manteniendo dentro del intervalo de corriente encontrado después de las 24 h. La gráfica de NaCl (no mostrada), tiene el mismo comportamiento que el agua de mar UV. Al tiempo cero (fig. 6b y 6c) la corriente es menor cuando se emplea Chelex-100, este valor tiende a estabilizarse a las 24 h, mientras que con el EDTA éste es casi constante hasta las 72 h, aunque el valor inicial de corriente es mayor. En general, la adición de cualquiera de los agentes quelantes produce una disminución significativa de la corriente al potencial de media onda del complejo de HCHO-GT, aunque ésta es menor para el caso del EDTA. Esto nos indica que las interferencias debidas al cine son minimizadas principalmente por la adición de CHELEX-100.

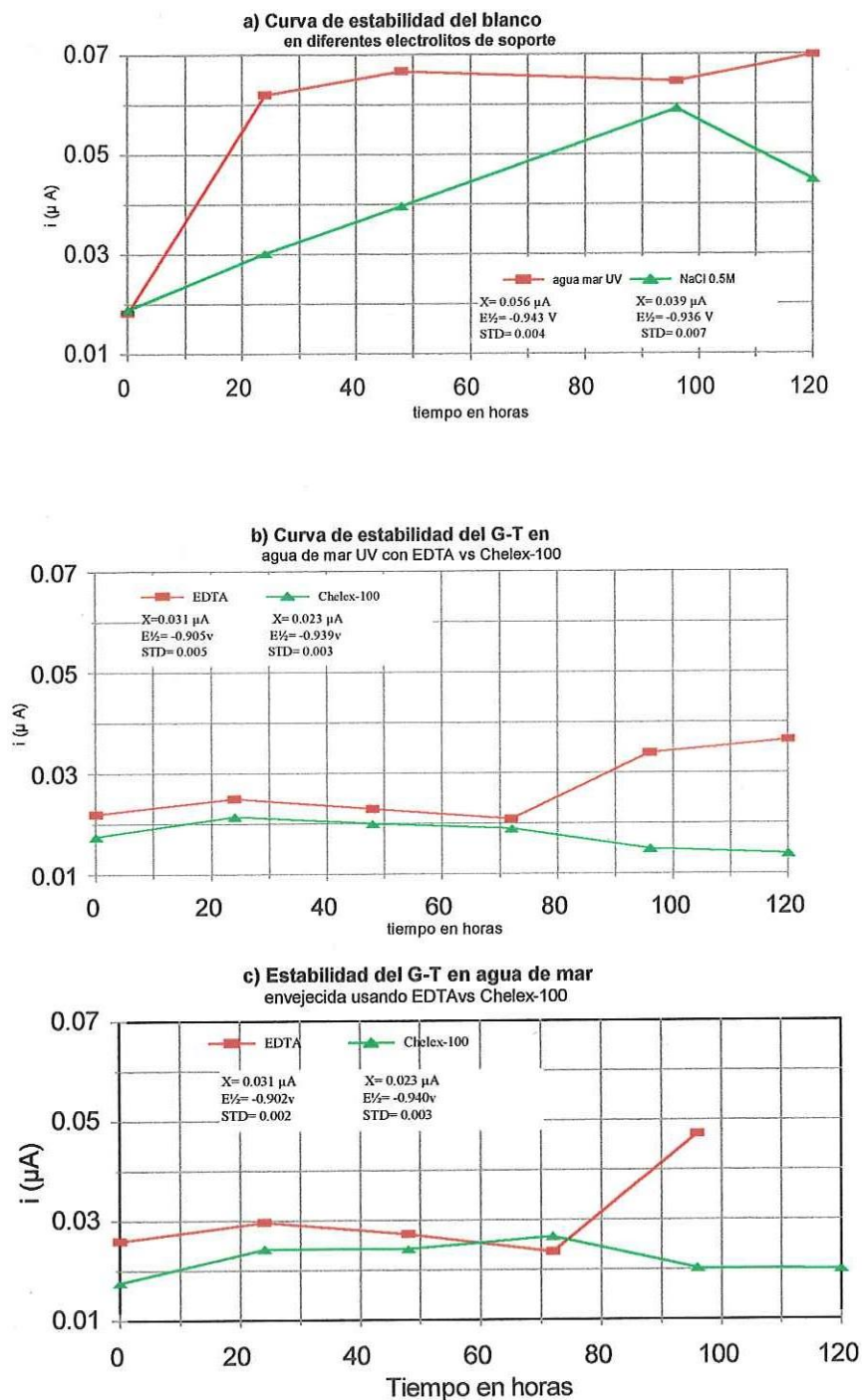


Figura 6 Series de tiempo que muestran la estabilidad de la corriente del blanco a pH 5 con respecto al tiempo, utilizando 0.5 ml de AG-T. a) Sin utilizar quelantes, en electrolitos de NaCl al 0.5 M y agua de mar UV; b) Agua de mar UV y c) agua de mar envejecida, estos dos últimos con 1×10^{-4} M de EDTA y agua de mar tratada con 0.5 ml de chelex-100. X = promedio de corriente generada por el blanco (i), $E_{1/2}$ = potencial de media onda y STD= desviación estandar de $E_{1/2}$.

2.4 Adición de un conservador

Debido a los resultados ya obtenidos, se decidió utilizar el NaCl 0.5 M como electrolito de soporte con Chelex-100 y empezar a probar la técnica con un estándar de 4 μM de formol, así como la adición de un conservador como el mercurio metálico (Hg^0) o mercurio iónico (Hg^{++}).

2.4.1 Preparación de los blancos

En seis matraces de 500 ml se añade a cada uno 2.5 ml de CHELEX -100, 12.5 ml de solución AG-T, recién preparada y a dos de ellos se les separa y se les etiqueta como "Blanco". A los 4 restantes se les trata de la siguiente manera: Se toman dos matraces a los cuales se le agrega 1 ml de mercurio en forma iónica proveniente de una solución de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ con una concentración de 0.5 gr L^{-1} , (para tener una concentración final de 1 mg L^{-1} de Hg) y se les etiqueta como blanco con Hg^{++} ; a los dos últimos matraces volumétricos se les adiciona 5 gotas de mercurio en forma metálica proveniente del electrodo de mercurio. Posteriormente a cada matraz se le afora con NaCl 0.5 M, cada uno de los blancos es transferido a matraces erlenmeyer de 500 ml, aquí se ajusta el pH a 5 y se sellan los matraces con parafilm. Después se agitan por 20 min. y se dejan reposar por 30 min. Posteriormente se toman alícuotas de 20 ml por duplicado cada vez que se realice el análisis con PPD descrita en el apartado IV.1.1.

2.4.2 Preparación del estándar

Se preparó un estándar de 4 μM de HCHO a partir de una solución patrón de $1 \times 10^{-4} \text{ M}$ de HCHO en NaCl 0.5 M, se transfirieron 20 ml de la solución patrón a seis matraces volumétricos de 500 ml, se añadió 200 ml de NaCl 0.5M a cada uno y a partir de aquí, se sigue con la metodología para los blancos, descrita en el párrafo anterior.

Los resultados se promedian y se grafican como corriente generada por la reducción del complejo HCHO-GT en el potencial de media onda de -0.946 V (aprox.) contra tiempo, para cada blanco. El estándar es corregido por el blanco para cada hora de muestreo (fig. 7).

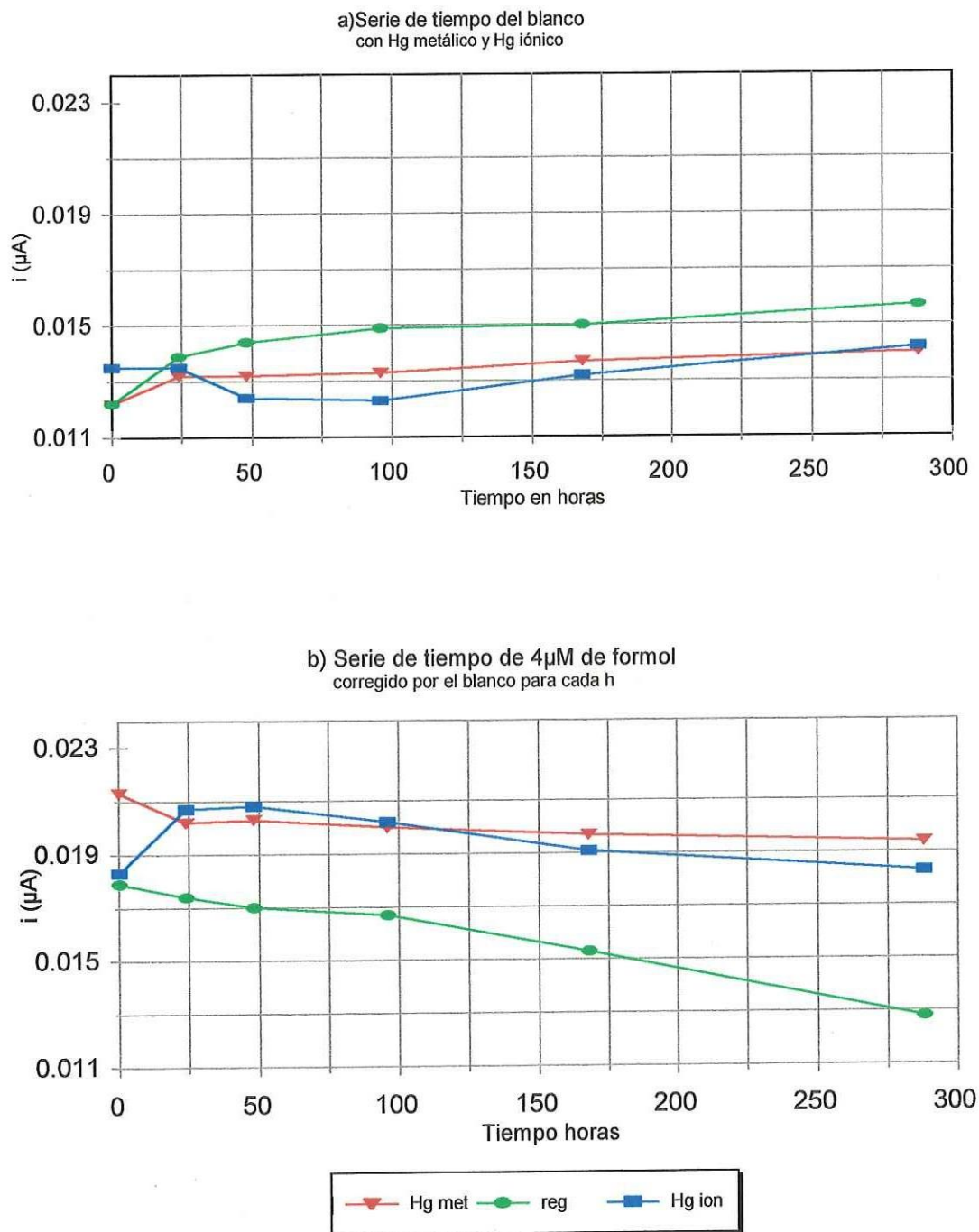


Figura 7 Efecto de la adición de mercurio como conservador en el blanco (a) y en el estándar de HCHO 4 μ M. (b) con respecto al tiempo. Utilizando NaCl al 0.5M como electrolito de soporte, (a pH 5, con 0.5 ml de G-T y 0.5 ml de Chelex-100). Donde: i =corriente, mercurio metálico=Hg met, reg= sin mercurio y mercurio iónico=Hg ion, a 1×10^{-4}

En la figura 7a se observa el comportamiento de los blancos al paso del tiempo. El blanco sin Hg y el blanco con Hg^0 presentan un comportamiento muy similar, aunque en diferente magnitud. La estabilidad de la corriente con el tiempo, se observa primeramente en el blanco con Hg^0 a las 24 h y se mantiene así hasta las 96 h. Este mismo comportamiento se observa para el blanco con Hg^{++} , alcanzando la estabilidad en la corriente a un mayor tiempo (48 hrs), ya que de las 0 a las 24 h se mantiene estable, después decrece y a las 48 h vuelve a estabilizarse, manteniéndose así hasta las 96 h para posteriormente volver a aumentar. Es importante mencionar que a diferencia del experimento anterior, los agregados bacterianos se empezaron a presentar después de 7 días (168 h), en el blanco que no tenía Hg, mientras que en el blanco con Hg^0 se presentan después de las 288 hrs y en el blanco con Hg^{++} no se presentan sino hasta las 408 h, con un valor de corriente $0.148 \mu\text{A}$. La ausencia de agregados bacterianos en el blanco sin Hg hasta los 7 días, puede deberse a que la temperatura ambiente se mantuvo de 23 a 25 °C (aprox.) durante el análisis de las muestras; mientras que en el blanco con Hg^0 puede deberse a la formación del cloruro de mercurio manifestado de forma física en la presencia de muchos puntos blancos en la superficie de la gota de Hg^0 .

En la figura 7b se muestran los valores de corriente obtenidos para los estándares y corregidos por el valor del blanco para cada hora de análisis. En esta figura nuevamente podemos observar que el HCHO sin Hg y con Hg^0 presentan el mismo comportamiento pero en diferente magnitud de corriente. La estabilidad la alcanzan los dos estándares después de las 24 h y la mantienen hasta las 96h, siendo más estable en el estándar con Hg^0 . Debe notarse que los valores obtenidos en los estándares que tienen Hg^{++} como conservador son muy similares después de las 24 h, de tal forma que se traslaparían los puntos si se graficaran los datos sin promediar. En el caso del estándar de $4 \mu\text{M}$ de formol sin adición de mercurio se observa una disminución de la corriente con el tiempo de almacenamiento. Este efecto puede indicarnos una degradación del complejo G-T-HCHO por la acción bacteriana. Las diferencias de corriente del complejo G-T-HCHO entre los estándares con y sin conservador (hasta $0.012 \mu\text{A}$ al final del experimento) es altamente significativa, por lo cual es recomendable usar Hg como conservador de las muestras y reactivos empleados.

3 Pruebas preliminares en la técnica propuesta.

De este apartado en adelante nos referiremos por "blanco" a aquella solución preparada conforme se describe en el apartado IV.2.4.1 con CHELEX-100 y Hg^0 ; el electrolito de soporte empleado durante cada experimento se encontrará indicado.

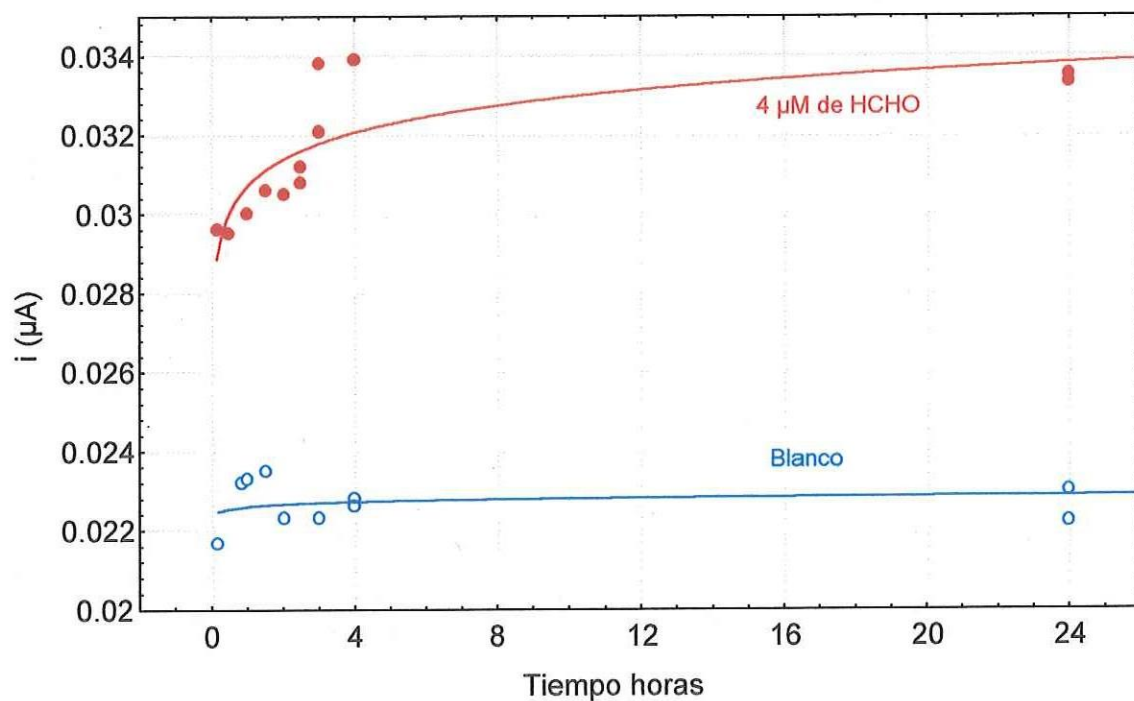
3.1 Tiempo de reacción

Se prepararon dos blancos y dos estándares de $4\mu\text{M}$ de formol (apartado IV.2.4) en NaCl 0.5M (ambas muestras con y sin Hg^0). En este experimento a las muestras no se les agregó Chelex-100 directamente, sino que a la solución AG-T se le agregaba el Chelex-100 y se le ponía agitar por 20 min., después se dejaba reposar por 30 minutos antes de su uso; lo anterior tiene la finalidad de conocer el tiempo de reacción desde el momento en que se agrega el reactivo de G-T a la solución. El tiempo cero llamado aquí, es en realidad 10 min. después de preparada la muestra (debido a los 8 min. de la purga más dos del barrido de potencial). El intervalo de muestreo fue de cada hora durante las primeras cuatro h, y posteriormente cada 24 h hasta finalizar el experimento. Los resultados se muestran en la figura 8 y se grafican contra el tiempo. Para fines prácticos, al estándar de $4\mu\text{M}$ de HCHO no se le corrigió por la corriente del blanco, ya que se pretende mostrar la pequeña variación en el valor de la corriente de este estándar con el paso del tiempo.

En la gráfica 8a, se observa que la reacción en promedio se estabiliza hasta las 4 h en la muestra con HCHO , y que esta aumenta desde $0.029\mu\text{A}$, a los 10 min., a $0.034\mu\text{A}$ las 4 h, con una ligera disminución a las 24 h ($0.033\mu\text{A}$). En el caso del blanco su variación hasta las primeras 4 h es grande, a partir de aquí, el blanco se estabiliza y se mantiene constante hasta las 24 h.

En la figura 8b tenemos el mismo comportamiento ya encontrado para el apartado IV.2.4, pero en este caso podemos observar que durante las primeras horas se observa un incremento en la corriente de los estándares, encontrándose un máximo a las 4 h de iniciado el experimento. Posteriormente, la corriente tiende a disminuir en el estándar de formol sin Hg^0 , mientras que en el que contiene Hg^0 se mantiene hasta el final del experimento. Por otra parte, la corriente encontrada en el blanco es muy variable durante

a) Tiempo de reacción del G-T con HCHO



b) Curva de estabilidad de la reacción de G-T con HCHO

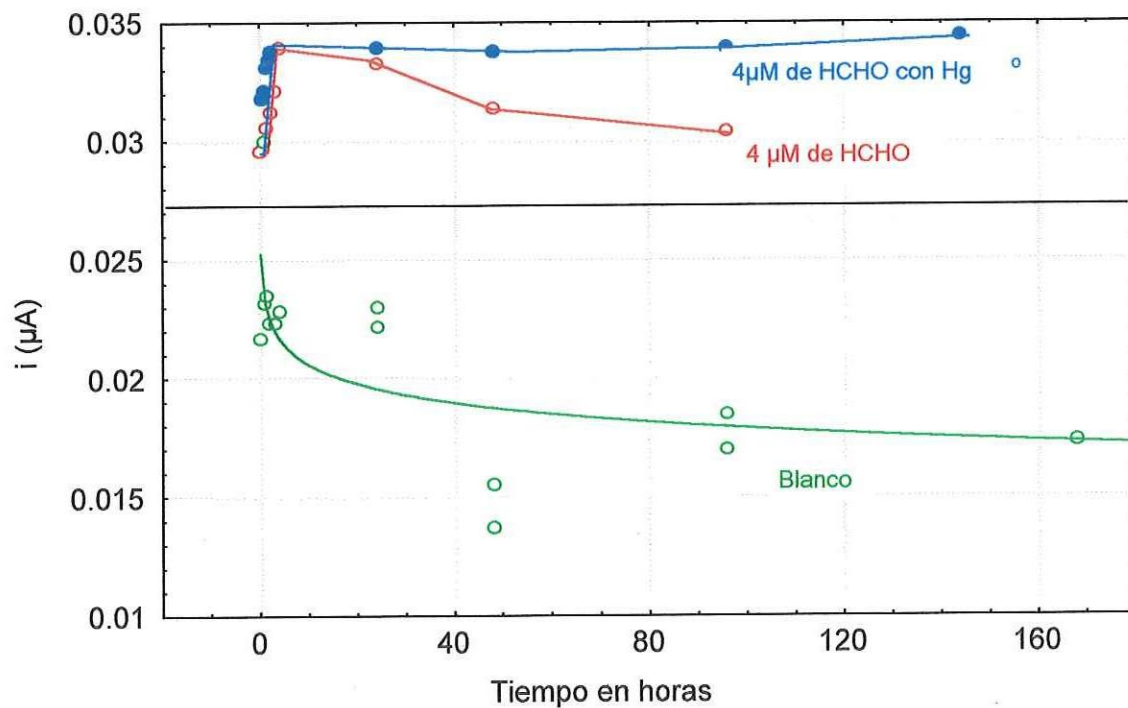


Figura 8 Tiempo de reacción (a) y estabilidad (b) del G-T con 4 μM de HCHO. Las líneas representan los promedios por triplicado. A la corriente (i) del estandar de 4 μM no se le resto la corriente producida por el blanco por lo cual la señal de este se muestra gráficamente.

las primeras horas pero posteriormente tiende a ser asintótica hacia el final del experimento. En esta gráfica se ajustó el comportamiento del blanco mediante la aplicación de una función logarítmica.

3.2 Cambios en el pH

Se sabe que el pH óptimo donde trabaja el G-T, va de 4 a 6 y que a $\text{pH} > 9$ el G-T precipita (Owen, 1962). Considerando esto, se realizan pruebas utilizando blancos con NaCl al 0.5 M (por triplicado) a tres valores de pH (4, 5 y 6). Los resultados se muestran en la tabla II y los polarogramas en la figura 9.

Tabla II Resultados observados cuando se cambia el valor de pH en los blancos con NaCl 0.5M como electrolito de soporte y utilizando la técnica modificada de PPD para determinar HCHO utilizando AG-T.

pH	$i(\mu\text{A})$	$E_{1/2} \text{ (V)}$	Observaciones
4.00	0.019 ± 0.005	-0.896 ± 0.010	La curva es amplia, con poca altura y el pico no es simétrico (fig. 9a).
4.97	0.017 ± 0.001	-0.946 ± 0.002	La curva es definida y tiene forma Gaussiana (fig. 9b).
6.02	0.019 ± 0.003	-1.011 ± 0.000	La curva es amplia y con poca altura pero mantiene su simetría (fig. 9c).

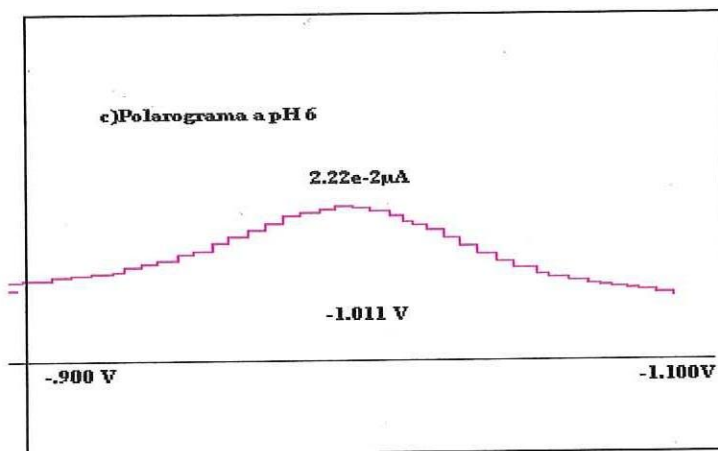
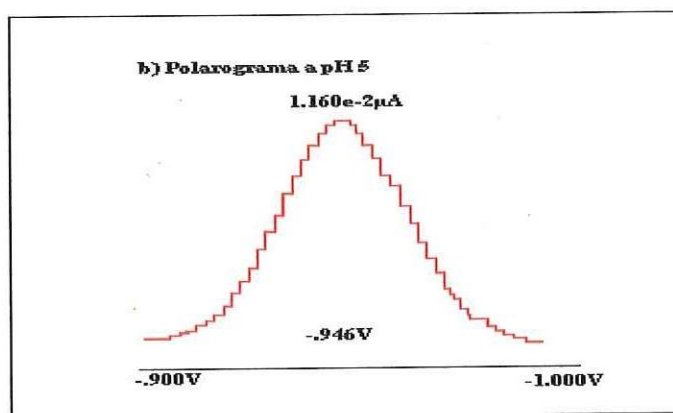
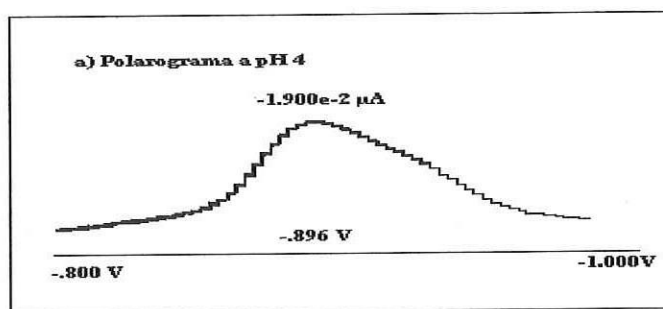


Figura 9 Polarogramas de los blancos a diferentes valores de pH [a) pH4, b) pH 5 y c) pH6], utilizando NaCl al 0.5 M como electrolito de soporte. Todos los polarogramas tuvieron las mismas características de barrido (-0.8 a -1.2 V), pero se representan sólo los intervalos de voltaje de cada señal, para su mejor apreciación

3.3 Interferencias con otros compuestos

Una de las características que debe reunir toda técnica polarográfica, es la de cumplir con una cierta resolución, al medir diferentes compuestos similares. Por esta razón se probó la capacidad resolutive de la técnica ya descrita (IV.2.4), en la medición de tres diferentes aldehídos de bajo peso molecular (acetaldehído, butaraldehído, y benzaldehído), en la medición de acetona, así como en ácido acético y nitrato de cinc. Los estándares orgánicos se diluyeron en una solución de NaCl 0.5 M, tratada con CHELEX-100, como se ha descrito anteriormente, para tener concentraciones de 1×10^{-4} M de cada estándar.

El desarrollo experimental fue el siguiente: Se preparaba un blanco en 20 ml NaCl 0.5 M, se ajustaba el pH a 5 y se aplicaba la técnica polarográfica descrita en el apartado IV.1.1 bajo las mismas condiciones que a los estándares de formaldehído descritas con anterioridad.

Posteriormente, se adicionaba 0.1 ml de cada estándar orgánico al blanco de NaCl 0.5 M, se ajustaba el pH a 5 y se aplicaba la técnica polarográfica. De esta manera se continuaba hasta terminar con la serie de estándares. Así mismo, se corrió un blanco de NaCl 0.5 M y un estándar de 10 μ M de formol bajo las mismas condiciones, para probar la reproducibilidad de la técnica.

Es importante señalar que no era necesario dejar pasar el tiempo de suficiente para completar la reacción entre el AG-T y cada estándar, ya que lo que se quiere mostrar es la capacidad resolutive y no una relación con la concentración. Por otro lado, para asegurar que el estándar reaccionara inmediatamente con el AG-T y que la señal fuera perceptible en el polarograma, se utilizaron concentraciones elevadas de cada estándar (10 μ M).

3.3.1 Grupos carbonilo y carboxilo de bajo peso molecular

En la tabla III se pueden observar los resultados obtenidos de los diferentes polarogramas, sus potenciales de onda media característicos y la magnitud de la señal de la corriente al aplicársele el potencial para los diferentes compuestos.

Tabla III Resultados mostrados en los polarogramas para cada compuestos con grupo carbonilo o cinc. concentración a la que se midió fue de 10 μ M en NaCl 0.5M Las señales no fueron corregido por el blanco.

Muestra	i (μ A)	$E_{1/2}$ (V)
Blanco	0.012	-0.940
HCHO	0.037	-0.937
Acetaldehído	0.022	-1.041
Butiraldehído + Acetaldehído	0.033	-1.042
Benzaldehído	0.085	-1.164
Acetona	No tiene un pico verdadero bajo estas condiciones	
Ácido acético	No tiene un pico verdadero bajo estas condiciones	
Cinc	0.052	-0.863

En la figura 10a y 10b se muestran los polarogramas del blanco y el estándar de formol. Aquí se puede observar que la magnitud de la corriente y el $E_{1/2}$, obtenidas en cada solución fueron similares a las mostradas en los experimento anteriores.

Mientras que el estándar de acetaldehído muestra una señal de corriente a un $E_{1/2}$ de -1.041 V, así mismo, el ancho del pico es mayor que el mostrado por el formol (fig. 10b). Al adicionar el estándar de benzaldehído aparece una tercera señal, más intensa (0.085 μ A) y definida, a un potencial más negativo (-1.164 V, fig. 11a). Esta diferencia -227 V con respecto al HCHO y -0.123 con respecto al acetaldehído nos permite identificar claramente ambas señales.

Finalmente, al adicionar el estándar de butiraldehído, se obtiene la señal mostrada en la figura 11b. Aquí podemos observar que el pico de acetaldehído se define más claramente, debido a que la corriente aumenta hasta 0.033 μ A como resultado de la adición de butiraldehído. Esto nos indica que el acetaldehído no puede ser diferenciado del butiraldehído cuando se encuentran presentes en la misma muestra.

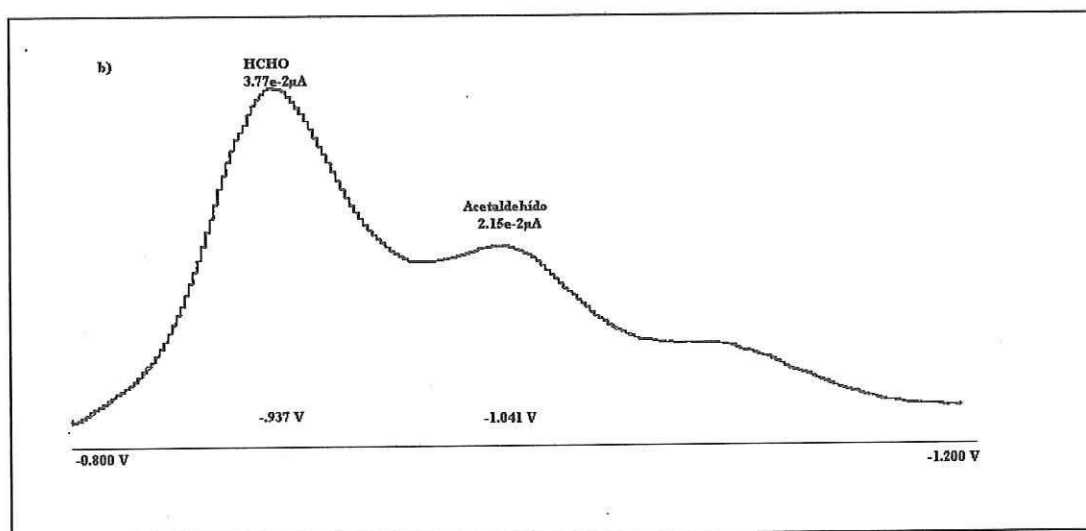
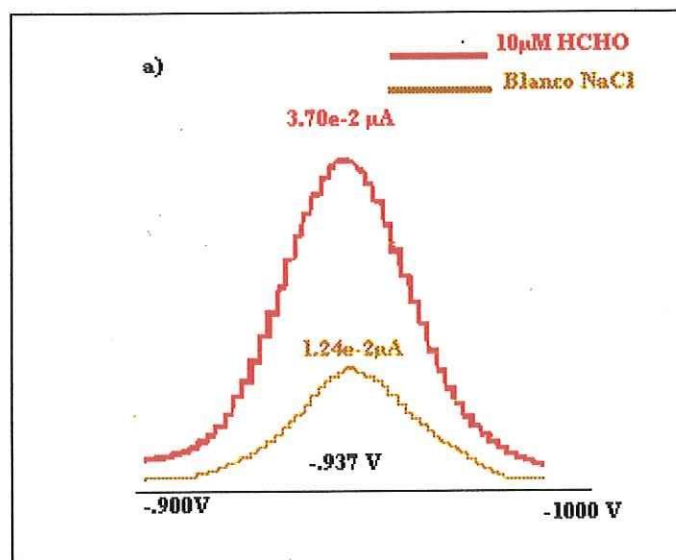


Figura 10. Polarogramas de referencia para comparar los valores obtenidos por la adición de carbonilos de bajo peso molecular a una misma muestra, para conocer las interferencias y los $E_{1/2}$ representativos. En la figura (a) se representan las señales de formol y el blanco de NaCl 0.5 M. En la figura (b) se muestra el polarograma obtenido después de adicionar acetaldehído ($E_{1/2}$ de -1.041 V) a un estándar de formol ($E_{1/2}$ de -0.937 V), ambos de 10 μ M de concentración. El barrido de potencial fué de -0.8 a -1.2 V (por cuestiones gráficas solo se presenta la zona de interés, en la gráfica a) .

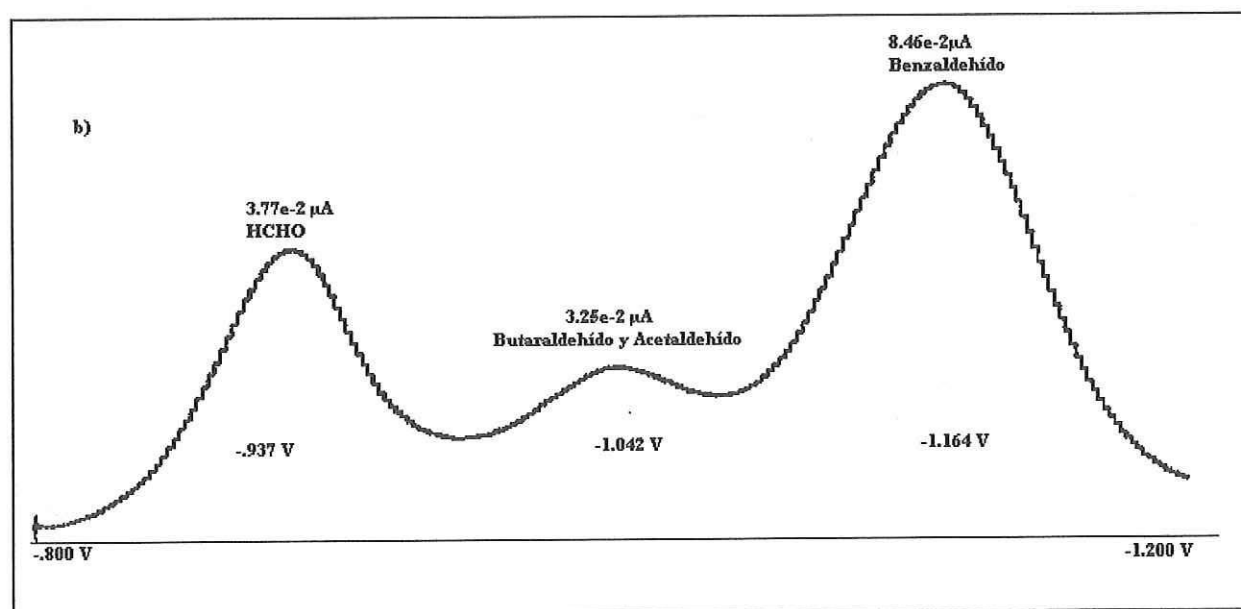
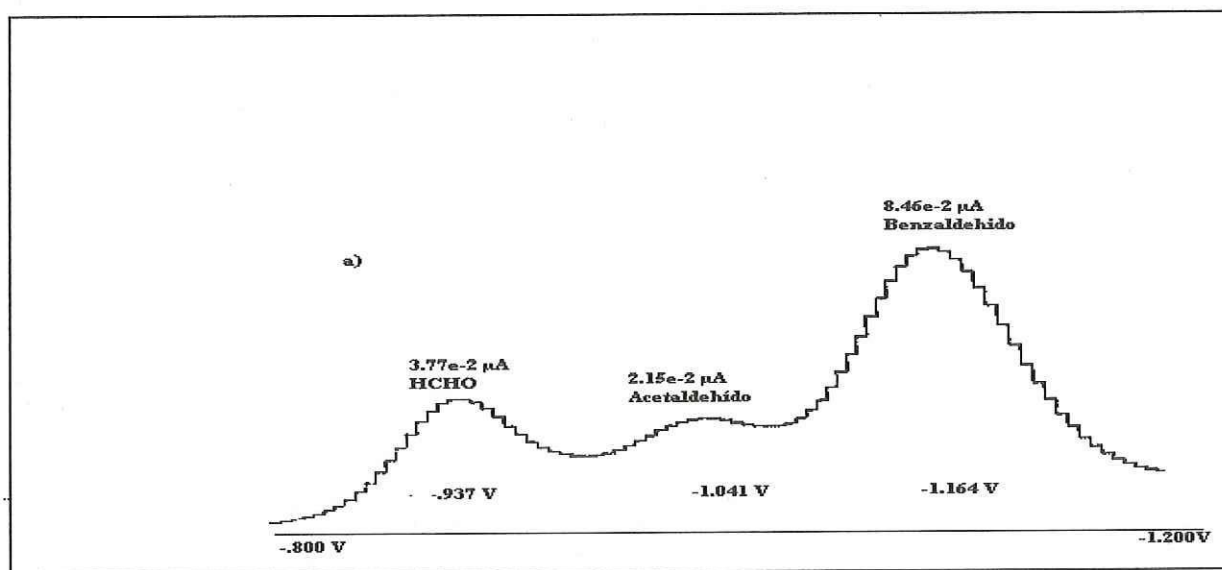


Figura 11 Polarogramas de referencia para comparar los valores obtenidos por la adición de carbonilos de bajo peso molecular y una concentración de 10 μM. a).- formaldehído, acetaldehído y benzaldehído; b).- formaldehído, acetaldehído, butaraldehído y benzaldehído.

4 Estándar de cinc

Del estándar patrón de cinc ($150 \mu\text{M}$) se preparó una curva de calibración en agua de mar UV (sin Chelex-100) con adición de estándares, con la finalidad de observar el comportamiento del mismo cuando de encuentra con la solución AG-T a pH 5 en agua de mar.

Los resultados se muestran en la tabla IV donde podemos observar que el potencial de $E_{1/2}$ para el blanco es -0.940 V y el del Zn^{+} tiene un promedio de $-0.863 \pm 0.005 \text{ V}$. Así que aunque aumente la concentración de Zn^{+} en el agua de mar UV, este potencial no afecta la determinación del HCHO con el reactivo de Girad-T.

Tabla IV. Curva de adición de Zn^{+} , en agua de mar UV, preparada de acuerdo a la técnica descrita en el apartado IV.2.4. i = corriente, $E_{1/2}$ = potencial de media onda .

μM de Zn	$i(\mu\text{A})$	$E_{1/2} (\text{V})$
0.00	0.0135	-0.940
0.15	0.0157	-0.858
0.30	0.0158	-0.858
0.45	0.0165	-0.858
0.60	0.0169	-0.858
0.75	0.0175	-0.869
0.90	0.0182	-0.863
1.05	0.0192	-0.869
1.20	0.0194	-0.869
1.35	0.0197	-0.869

4 Aplicación de la técnica modificada

4.1 Curvas de calibración en NaCl 0.5 M y agua de mar irradiada con UV. Consumo de solución AG-T

Para este experimento se realizó una serie de curvas de calibración en el intervalo de 0.0 a 10 μM de formol. La preparación de estos estándares (por duplicado) es la descrita en el apartado IV.2.4 y se utiliza Hg° como conservador. La muestra en NaCl 0.5 M o agua de mar UV, se dejó reaccionar 4 h antes de realizar el barrido de potencial (-0.8V a -1.8 V). Los resultados corregidos de cuatro curvas de calibración en NaCl 0.5M se muestran en la figura 12a. La regresión lineal se realizó con intervalos de confianza al 95 % (fig. 12a). El coeficiente de determinación de la regresión fue de 0.9852 y el límite de detección de 0.312 μM de HCHO. Este último se calculó a partir de la ecuación de la línea recta y de la desviación estándar (S) de 20 blancos mediante la siguiente ecuación:

$$\text{L.D.}(\mu\text{M}) = 2 \cdot S \cdot 260.608 + 0.182.$$

La precisión calculada a partir de los coeficientes de variación de cada estándar, para las cuatro curvas fue de 1.53 a 4.99 % para todas las concentraciones.

En la figura 12b se muestra el comportamiento de la corriente de la señal de G-T con la adición del estándar de HCHO. La disminución de la corriente con la adición de HCHO se puede interpretar como un consumo de G-T debida a la formación del complejo HCHO-GT. Este consumo tiene un comportamiento lineal con respecto a la adición de formol a una razón de 0.019 $\mu\text{A}/\mu\text{M}$ de HCHO. Es importante notar que la adición de 0.5 ml de reactivo de G-T es suficiente aún a concentraciones tan altas como 10 μM de HCHO, ya que la corriente de la señal de G-T es de 1.66 μA , la cual es un valor alto en comparación con la corriente generada por la reducción del complejo HCHO-GT (0.04 μA , fig. 12a). Esto nos indica que se requerirían cerca de 100 μM de HCHO para consumir todo el reactivo de G-T.

En la figura 13 se muestra el polarograma obtenido con el estándar de 10 μM de HCHO. Aquí se observa que la señal de corriente del complejo HCHO-GT ($E_{1/2} = -0.930$ V) es mucho menor que la señal producida por el reactivo de G-T ($E_{1/2} = -1.666$ V). Sin

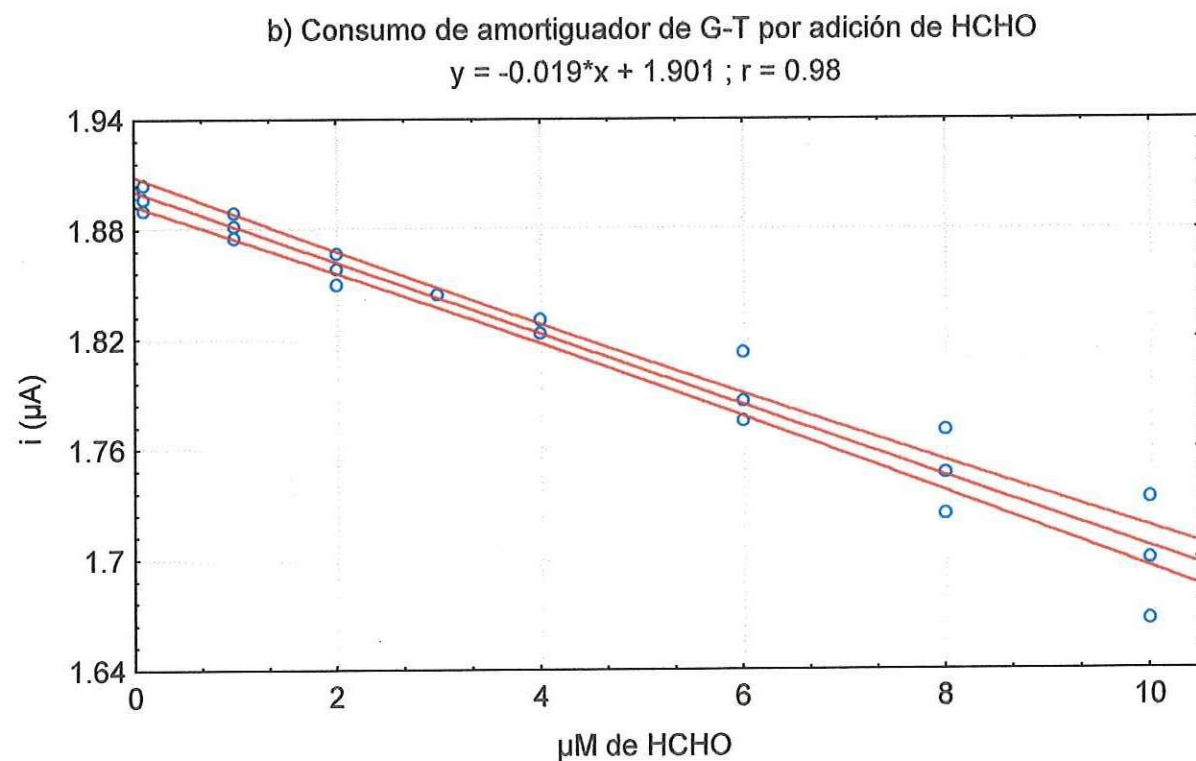
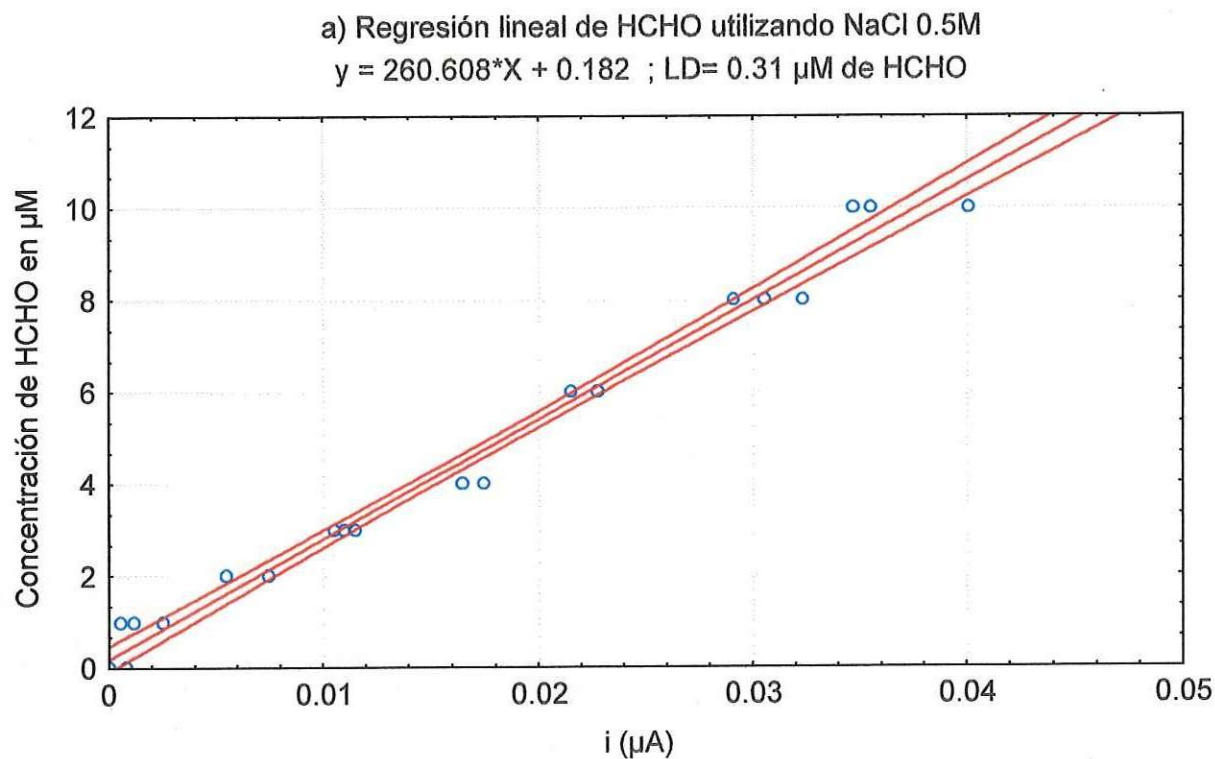


Figura 12 Regresión lineal de HCHO (a) en NaCl al 0.5M con 0.5 ml de solución amortiguadora de G-T , con una $r^2 = 0.0966$; y consumo de la solución AG-T (b) para la misma curva de calibración de formaldehído (n=36).

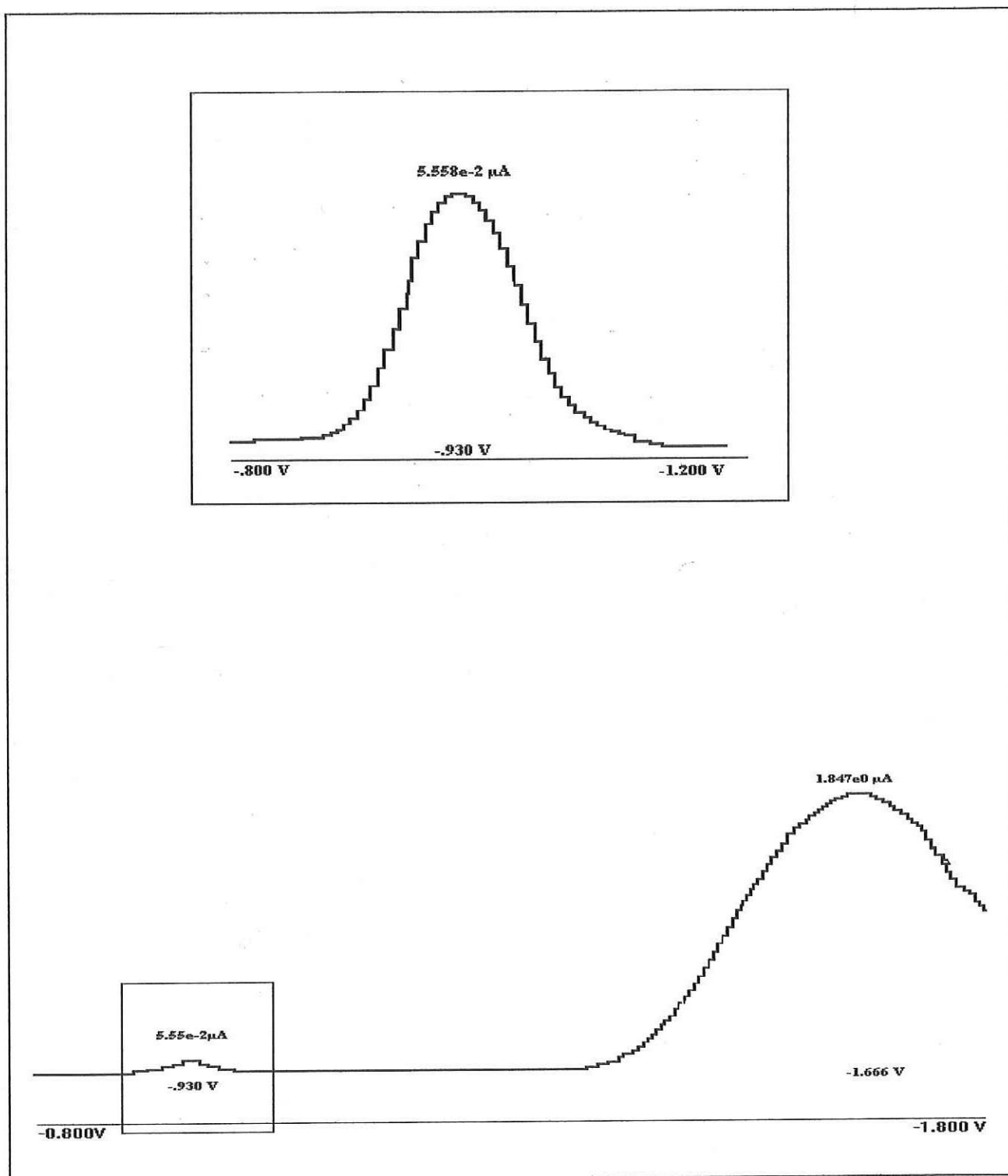


Figura 13 Polarograma de $10\text{ }\mu\text{M}$ de HCHO en NaCl 0.5 M , con un potencial de barrido de -0.8 a -1.8 V (figura inferior). El recuadro superior corresponde a la aplicación del -0.8 V a -1.2 V .

embargo, la señal es reconocida por el polarógrafo debido a que presenta un programa de reconocimiento de picos por comparación de la señal a una función Gaussiana. La señal del complejo HCHO-GT se muestra ampliada en el recuadro, figura 13, donde se puede apreciar que es un pico bien definido y diferenciable de la señal de fondo

En la figura 14 se muestra la curva de calibración construida para HCHO en agua de mar irradiada por UV, a partir de 60 datos obtenidos en diferentes fechas. De aquí es importante notar que la pendiente de la línea recta es casi el doble que la encontrada para la solución de NaCl (fig. 12a), esto tal vez se deba a la interacción del complejo G-T con los otros constituyentes del agua de mar y que por ello también el límite de detección aumenta al doble ($0.667 \mu\text{M}$ de HCHO). También, la precisión disminuyó y fue más variable que la encontrada en las curvas de calibración hechas en NaCl (6.81 a 25.63 %).

En la figura 15 se muestra el polarograma del estándar de $10 \mu\text{M}$ de HCHO en agua de mar UV. En dicho polarograma al potencial de $E_{1/2}$ (-1.666 V) de la señal de G-T presenta una ligera curvatura debido tal vez a la reducción de otro complejo formado con otros iones del agua de mar. En la figura 15 se muestra la señal del complejo HCHO-GT ampliada, aquí podemos observar que la simetría del pico es similar a la encontrada en la solución de NaCl, por lo que la presencia de otros iones sólo afecta en la magnitud de la señal y no en su forma.

En la figura 16 se muestran los histogramas de frecuencia para los potenciales de media onda ($E_{1/2}$) para la señal de HCHO en dos diferentes electrolitos de soporte. Estas gráficas fueron construidas a partir de los datos de las curvas de calibración en solución de NaCl y en agua de mar irradiada con luz UV, con un total de 36 y 60 datos, respectivamente. Para el caso de la solución de cloruro de sodio el $E_{1/2}$ presentó valores de -0.94 a -0.96 V para el 75 % de los datos con una pequeña variabilidad (1.29 %, fig. 16a). Es importante notar que el promedio de $E_{1/2}$ del HCHO en la solución de cloruro de sodio (-0.944 V), es muy consistente con el promedio de la $E_{1/2}$ del HCHO en agua de mar UV (-0.946 V) con una variabilidad similar (1.28 %, fig. 16b). También, es notoria la tendencia de los datos a ajustarse a una función normal. Ambos casos nos indican que el valor de $E_{1/2}$ son reproducibles en ambos electrolitos de soporte.

Por otra parte el $E_{1/2}$ del reactivo de G-T presentó un valor promedio de -1.664 V en solución de NaCl y de -1.665 V en agua de mar UV (fig. 17). Como en el caso del $E_{1/2}$ de HCHO-GT, su variabilidad y consistencia fueron similares en ambos electrolitos de soporte, lo cual nos habla de que el valor de $E_{1/2}$ para el reactivo de G-T es reproducible.

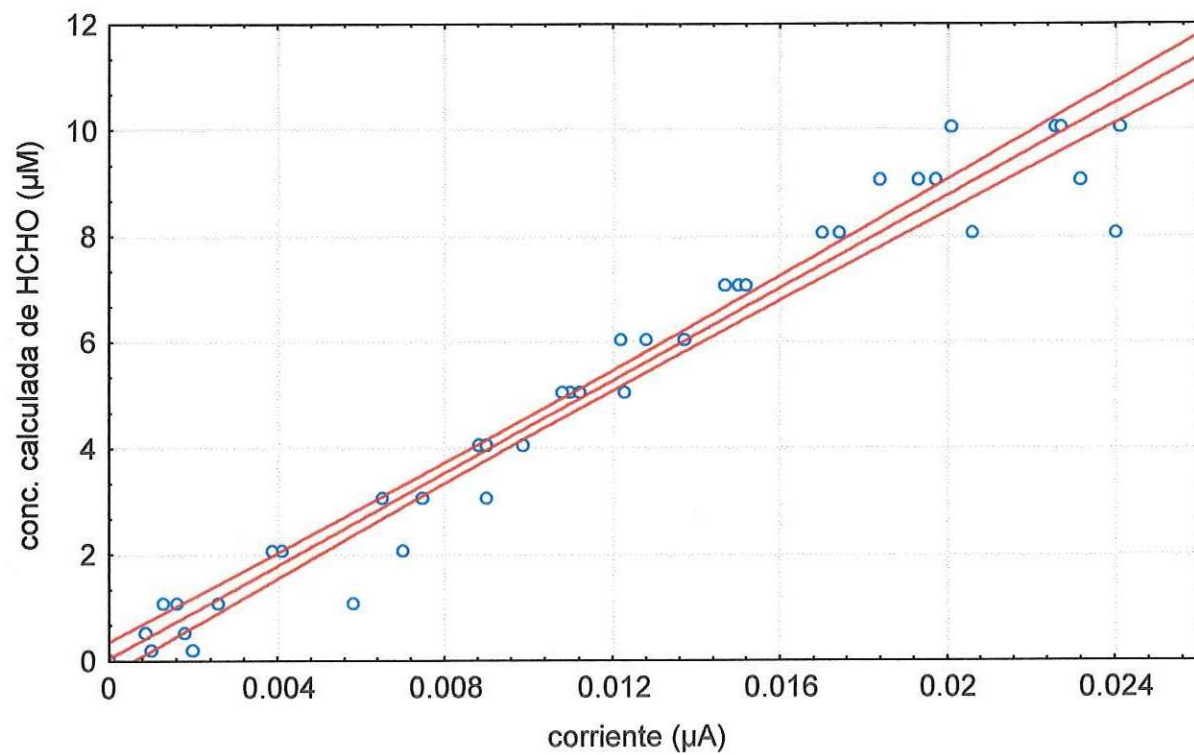


Figura 14 Regresión lineal de HCHO en agua de mar UV, a pH 5 y 0.5 ml de sol. amortiguadora de G-T. El límite de detección calculado fué de 0.667 μM . Número de datos 60. $Y = 418.12 \cdot X + 0.3134$ y $r^2 = 0.985$. La corriente es corregida por la corriente del blanco.

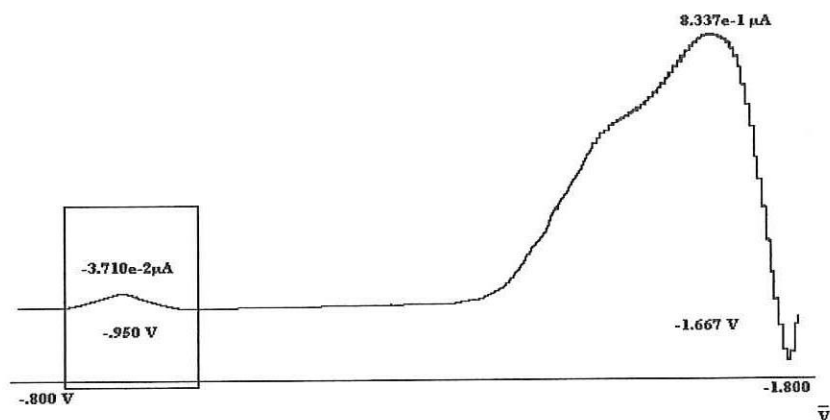
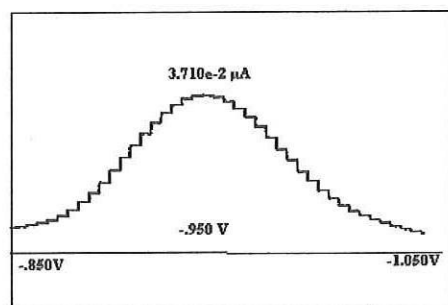
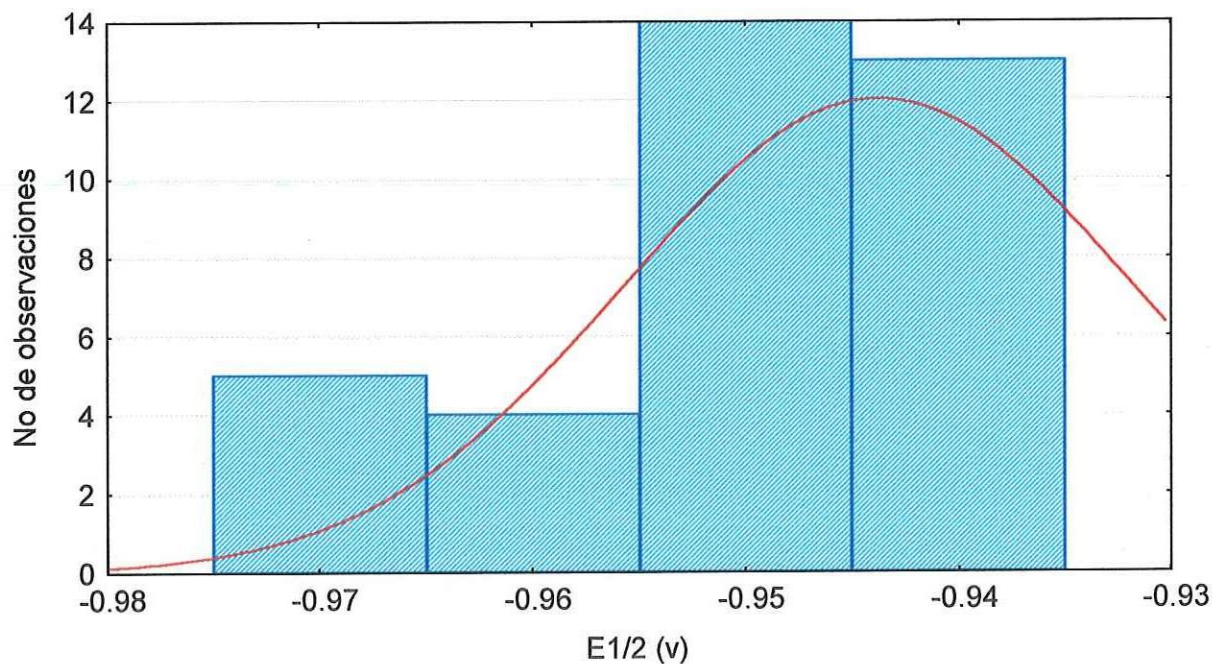


Figura 15 Polarogramas de $10\text{ }\mu\text{M}$ de HCHO en agua de mar UV. El recuadro superior corresponde al $E_{1/2}$ de reducción del HCHO ampliado de la figura inferior. El potencial de -1.666 V , corresponde al del G-T.

a) Histograma de $E_{1/2}$ para HCHO utilizando NaCl al 0.5 M

$n=36$; $\bar{x} = -0.944V$; $STD = 0.012V$;



b) Histograma de $E_{1/2}$ para HCHO utilizando agua de mar UV

$n = 60$; $\bar{x} = -0.946V$, $STD = 0.012 V$

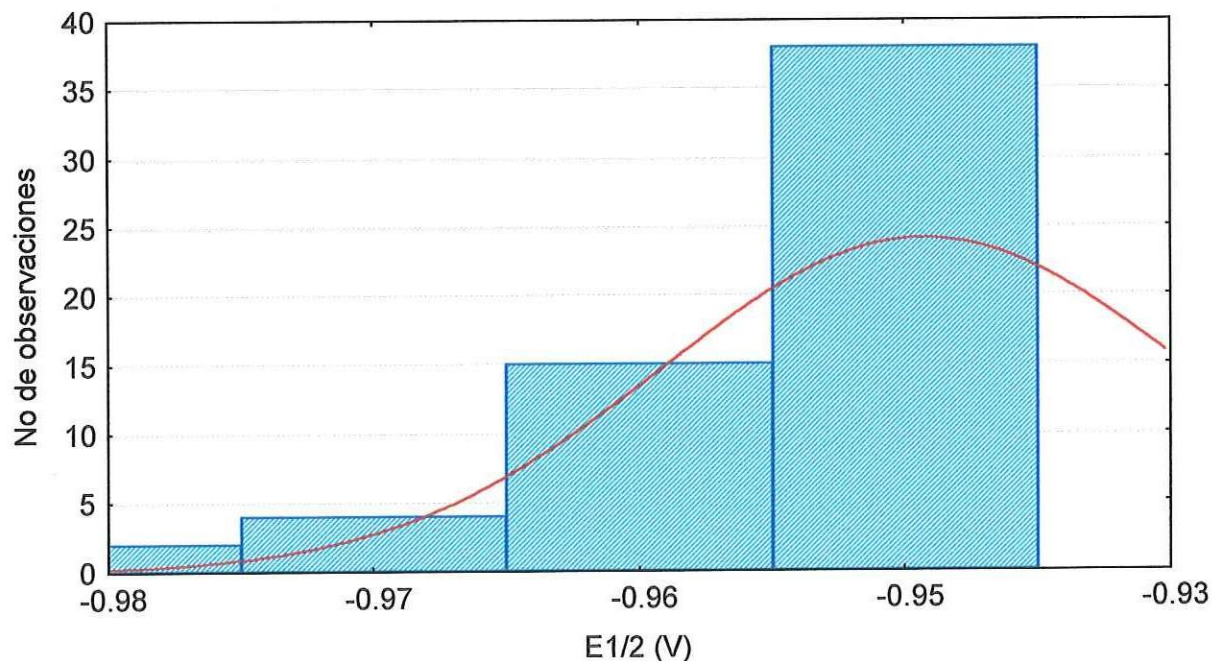


Figura 16 Histogramas de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de HCHO, utilizando 0.5 ml de solución amortiguadora de G-T, en dos diferentes electrolitos de soporte tratados con chelex-100. Donde $\bar{X}$ = potencial promedio y STD = desviación estandar del potencial

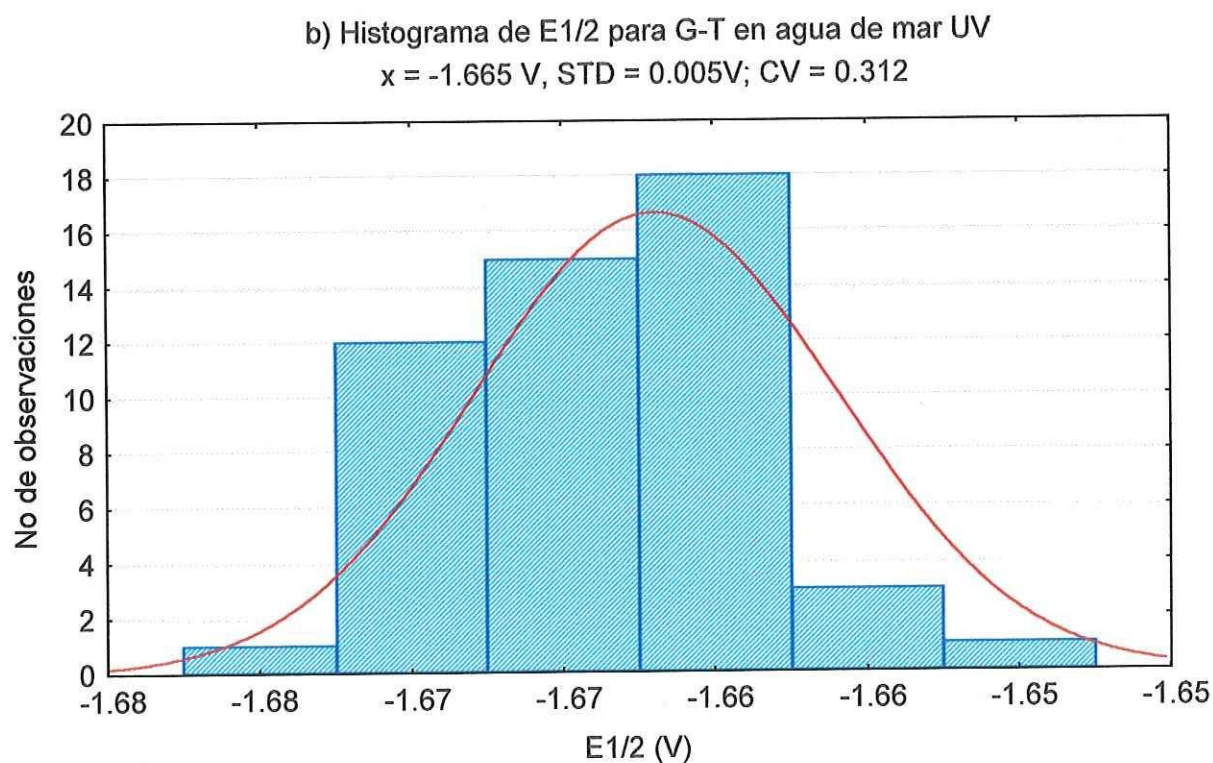
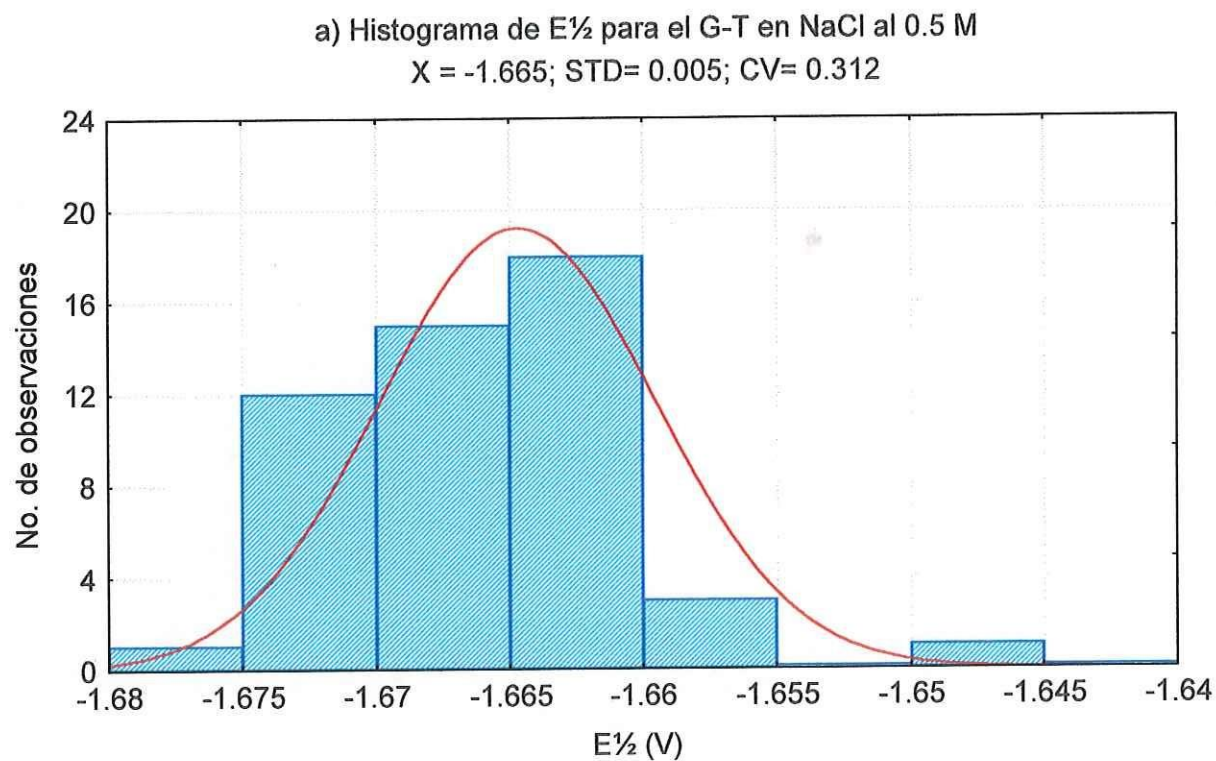


Figura 17 Histogramas de frecuencia del potencial de media onda ($E_{1/2}$) de AG-T, en dos diferentes electrolitos de soporte tratados con chelex-100 . Donde: X = potencial promedio, STD = desviación estandar del potencial y CV = % del coeficiente de variación. Las escalas del eje x, son muy similares aunque no iguales.

4.2 Aplicación de la técnica polarográfica en muestras de agua de mar

Se tomaron 3 muestras superficiales de agua de mar, provenientes de la zona costera ubicada a un costado de la FCM y anterior a las descargas de aguas residuales de la FCM y del Hotel Punta Morro, Ensenada, B.C., también se colectaron 3 muestras de agua de mar a 5 m de distancia del effluente de aguas residuales de la FCM hacia mar adentro, en el mes de agosto de 1997. Aunado a esto, se monitoreo el agua de mar envejecida durante 6 meses y que contaba con una alta concentración de microorganismos (microalgas, hongos y bacterias).

La toma de muestras (excepto para el agua de mar envejecida, donde se tomó la muestra de forma directa en el laboratorio) se realizó en botellas de plástico 1L de capacidad, previamente lavadas siguiendo la rutina descrita al principio de la metodología para la limpieza del material y enjuagadas con el agua de mar en la zona donde se realizó la toma de muestras. Las botellas fueron llenadas evitando el burbujeo e inmediatamente se llevaron al laboratorio donde se tomó una alicuota de 100 ml y se le añadió solución AG-T (2.5 ml) y 0.5 ml de solución con CHELEX -100. Después se ajustó el pH a 5 y los frascos fueron sellados con parafilm, se agitaron por 30 min., se dejaron reposar por espacio de 12 h. Transcurrido este tiempo se tomaron alicuotas de 20 ml por triplicado y se les aplicó la técnica de PPD bajo las condiciones ya establecidas. A la par se realizaron tres blancos en agua de mar UV para corregir los valores. Los resultados se muestran en la tabla V, donde se utiliza la curva de regresión para agua de mar UV (fig. 14), para obtener los valores de concentración en μM de HCHO.

Como se observa en la tabla V, las mayores concentraciones de HCHO se encuentran en el agua de mar impactada por el effluente de aguas negras de la FCM con un promedio de $5.1 \pm 0.4 \mu\text{M}$ de HCHO, mientras que el agua a mar que no esta impactada muestra concentraciones promedio de $1.7 \pm 0.6 \mu\text{M}$ de HCHO; estos valores son ligeramente menores que los encontrados en el agua de mar envejecida. Esta última presentó valores de $2.0 \pm 0.4 \mu\text{M}$ de HCHO, los cuales se asemejan a los encontrados cuando se inició el estudio (4 meses antes) figura 16, a pesar de contar con la presencia de microorganismos y que han pasado 6 meses desde que se preparó. Esto nos puede indicar que existe una producción y consumo natural en un "cultivo cerrado".

Tabla V Resultados de los polarogramas utilizando PPD en diferentes muestras de agua de mar. La ecuación de la recta empleada para calcular la concentración en μM de HCHO es la encontrada en la regresión lineal de agua de mar UV mostrada en la figura 13. Los resultados mostrados son el promedio de los duplicados para cada muestra.

Muestra	$i(\mu\text{A})$	$E_{1/2}$ (V)	$i(\mu\text{A})$ Corregida	μM HCHO
Blancos de agua de mar UV	0.0131 ± 0.004	-0.940	0.0000	0.00
Agua de mar	0.0150	-0.937	0.0019	1.11
	0.0164	-0.937	0.0033	1.70
	0.0177	-0.940	0.0046	2.24
Agua mar envejecida	0.0173	-0.936	0.0042	2.07
	0.0160	-0.941	0.0029	1.53
	0.0180	-0.940	0.0049	2.36
Agua mar a 5 m efluente de aguas negras	0.0240	-0.940	0.0109	4.87
	0.0256	-0.940	0.0125	5.54
	0.0240	-0.940	0.0109	4.87

4.3 Perfil de HCHO en el Golfo de California

Con la finalidad de probar la técnica de PPD en agua lejana de la costa y conocer la concentración de HCHO a diferentes profundidades, se utilizaron algunas muestras colectadas durante el crucero MEGAMARCO II, realizado en abril de 1997, en el Golfo de California. Estas corresponden a la estación 19 ubicada en la parte central del Golfo ($24^\circ 57' 46''$ de latitud norte y $109^\circ 44' 49''$ de longitud oeste).

Debido a que las concentraciones de HCHO en agua de mar oceánica, reportadas por otros autores, por lo general son del orden de nM y a que el LD es de $0.67 \mu\text{M}$ de HCHO, en agua de mar UV, con la técnica de PPD bajo las condiciones del apartado IV.1.1, se tuvieron que concentrar las muestras mediante la coprecipitación del HCHO-GT y de forma parcial los carbonatos de Ca^{++} y Mg^{++} , con NaOH 1M (Williams y Zirino 1964) para detectar concentraciones menores del LD.

4.3.1 Coprecipitación

Se tomaron alicuotas de 200 ml de cada muestra y se colocaron en embudos de separación de 250 ml de capacidad. A estas se les agregó 5 ml de reactivo AG-T y se ajustó a pH 5, dejándolas reaccionar toda la noche. Posteriormente, se coprecipitó el

complejo HCHO-GT formado, con NaOH 1 M a un pH entre 9.2 y 9.7 y se dejaba precipitar hasta obtener un sobrenadante claro. El precipitado se transfería a tubos de centrífuga graduados (volumen recibido de 20-28 ml) y se redisolvió con HCl 1M a un pH no menor de 4. Finalmente se ajustaba el pH a 5 y se aplicaba la técnica de PPD, anteriormente descrita. Simultáneamente se corrió, un estándar de 2 μM y un blanco en los tres diferentes electrolitos de soporte (por triplicado), con los que se calculó el porcentaje de recuperación.

Al mismo tiempo se tomaron alícuotas de 20 ml del sobrenadante, del embudo de separación, a las cuales se les ajustó el pH a 5 y se les aplicó la misma técnica de PPD.

Los resultados obtenidos con las muestras se suman en la tabla VI. Aquí podemos observar que las concentraciones de HCHO eran detectables en el 50 % de los casos sin necesidad de coprecipitarlas, mientras que las muestras restantes no iba a ser posible medir sin concentrarlas. En la figura 18 se puede observar que existen máximos valores de HCHO en la superficie, a 600 m y 700 m de profundidad. Estos últimos coinciden con el mínimo de oxígeno ($0.201 \text{ mg O}_2 \text{ L}^{-1}$). Por otra parte la concentración de HCHO tiende a disminuir a los 800 m cuando la concentración de O_2 comienza a aumentar.

En la figura 19 se muestran los polarogramas del precipitado recuperado y del sobrenadante de la muestra de 600m. Aquí podemos observar que existe una señal bien definida en el precipitado (fig. 19a). Por otra parte el sobrenadante mostró una señal de HCHO menos simétrica y con una corriente similar a la obtenida en los blancos de agua de mar UV ($0.013 \mu\text{A}$). También se observa una segunda señal a -1.526 V y con una corriente de $0.257 \mu\text{A}$ (fig. 19b). A un potencial más negativo (-1.716 V) se observa el pico de G-T, el cual aparece a un potencial de -1.647 V en el precipitado (fig. 19a). Este comportamiento se observó a todas las profundidades.

Para el cálculo del porcentaje de recuperación, se consideró que la corriente que debería medirse en el precipitado del estándar de 2 μM de HCHO, debería corresponder a una concentración de 20 μM , por el factor de concentración (200 ml/ 20 ml). Esta corriente se midió de un estándar de 20 μM de HCHO en agua de mar UV (promedio de

dos determinaciones de $0.051 \mu\text{A}$) y se comparó con la corriente medida en el precipitado del estándar de $2 \mu\text{M}$ en los diferentes electrolitos de soporte: agua de mar

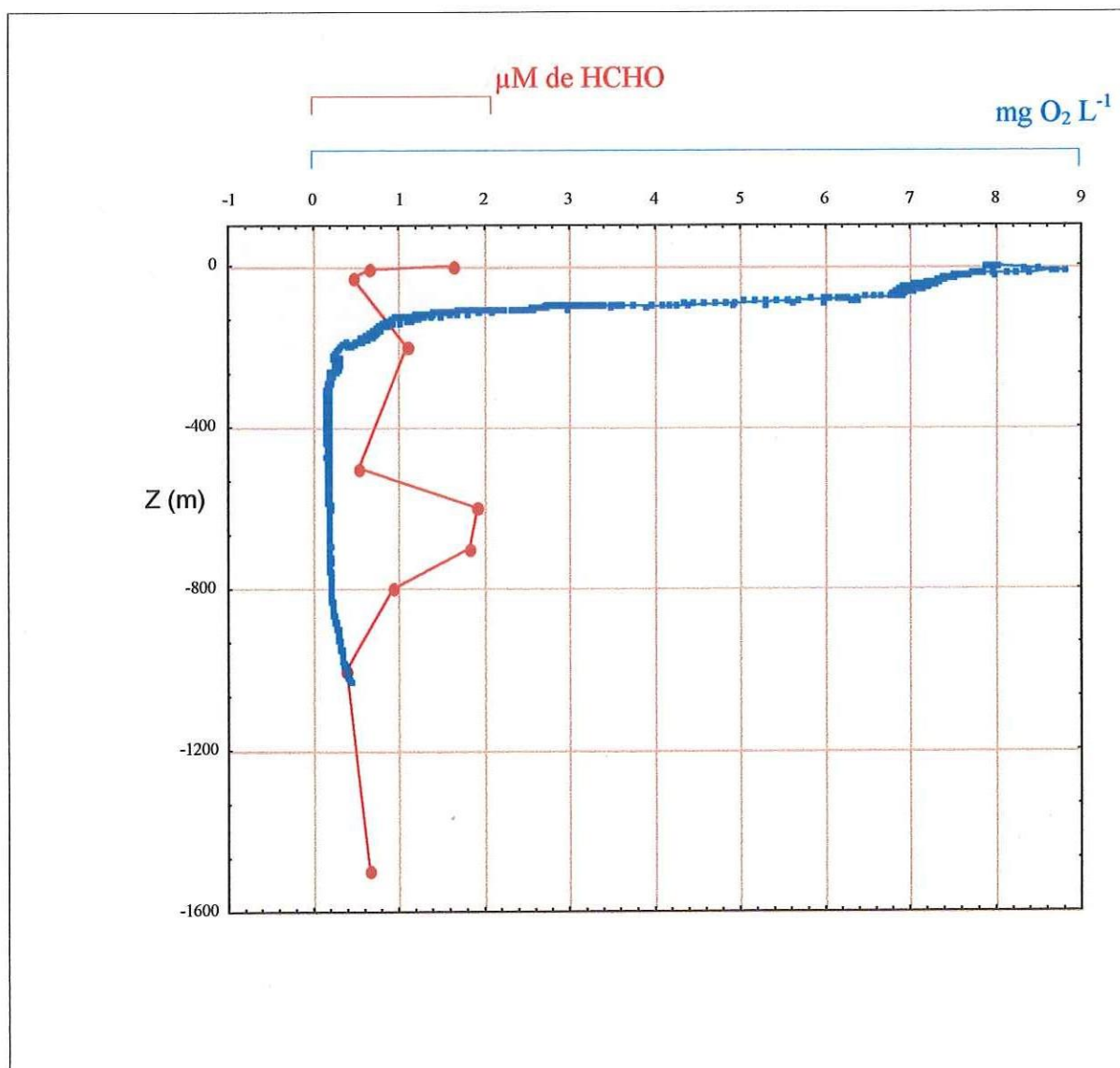


Figura 18 Variación de la concentración de oxígeno disuelto (línea azul) y HCHO (línea roja), con la profundidad (Z), en la estación 19 en el Golfo de California, México. Las unidades en el eje "x" corresponden a mg L^{-1} para el oxígeno disuelto y en μM para el HCHO.

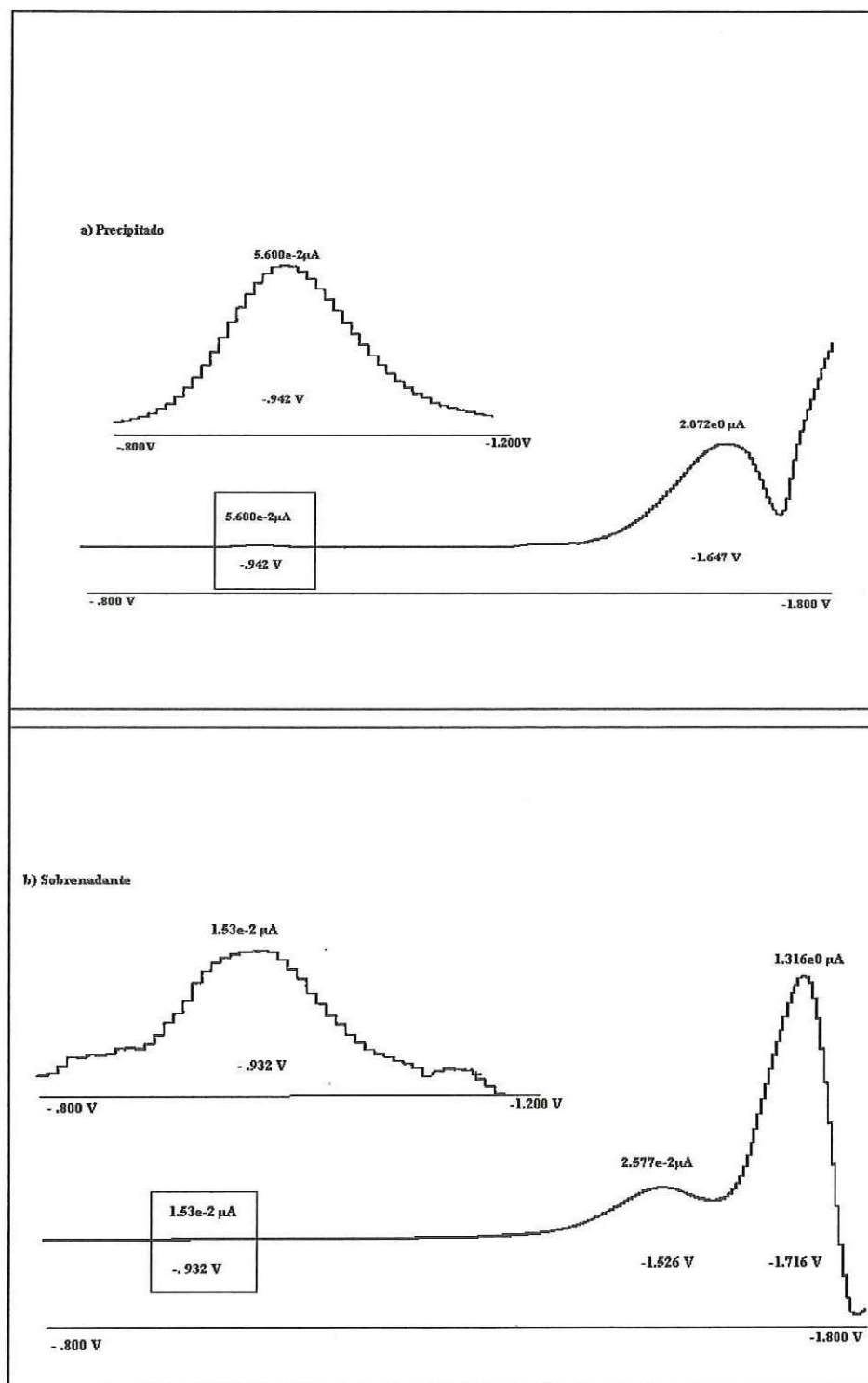


Figura 19 Polarogramas aplicando la técnica de coprecipitación en agua de mar, para concentrar el HCHO, perteneciente al Golfo de California a una profundidad de 600 m. Precipitado (a) y sobrenadante (b). El recuadro se refiere al $E_{1/2}$ donde aparece la señal del HCHO, esta señal se encuentra ampliada en la gráfica superior del mismo inciso.

natural (0.042 μA), agua de mar UV (0.047 μA) y agua de mar envejecida (0.049 μA). Los resultados mostraron que el porcentaje de recuperación era del 82 % en agua de mar natural, 92.33% en agua de mar UV y 96 % en agua de mar envejecida. Es importante mencionar que la corriente medida y corregida por blanco en los sobrenadantes (0.0015 y 0.0102 μA) correspondían a un porcentaje del 3 al 20 %.

En la figura 20 se muestran los polarogramas del blanco y del estándar de 2 μM en agua de mar envejecida antes de aplicarse la coprecipitación con NaOH al 1 M, las corrientes para dichas señales fueron de 0.017 μA y de 0.022 μA , respectivamente. Los $E_{1/2}$ para ambos casos fue de -0.927 V, estos valores fueron similares a los encontrados en experimentos anteriores.

Sin embargo, después de la coprecipitación se observa un aumento significativo en la corriente (0.066 μA) del precipitado del estándar de agua de mar envejecida a un potencial de -0.967 V (fig. 21a). En el caso del sobrenadante del agua de mar envejecida no tenemos la señal característica del formaldehído, sin embargo, el polarograma presenta la misma forma que el agua de mar natural (fig. 19b), a potenciales mayores de -1.5 V, donde se aprecia una señal a -1.531 V de 0.202 μA y el pico de G-T a -1.722 V con una corriente de 1.397 μA (fig. 21b).

Tabla VI Resultados de la técnica de coprecipitación de HCHO en agua de mar a diferentes profundidades. Donde i es la corriente (μA), $E_{1/2}$ es el potencial de media onda de la señal del complejo G-T-HCHO (V), V es el volumen de muestra analizado (ml), $I_{\text{corr.}}$ es la corriente corregida por la señal del blanco (μA), CM es la concentración del precipitado calculada a partir de $I_{\text{corr.}}$ y CR es la concentración corregida por volumen de muestra y por porcentaje de recuperación. La corriente presentada por el blanco en agua de mar UV fue de 0.0131 y la $E_{1/2}$ de -0.940 El potencial ($E_{1/2}$) tiene un promedio de -0.938 ± 0.005

Profundidad (m)	i (μA)	$E_{1/2}$ (V)	V (ml)	$I_{\text{corr.}}$ (μA)	CM μM de HCHO	CR μM de HCHO
0	0.052	-0.942	200	0.039	16.41	1.78
10	0.028	-0.937	200	0.015	6.50	0.70
30	0.023	-0.932	200	0.010	4.62	0.50
200	0.039	-0.932	200	0.026	10.98	1.19
500	0.027	-0.927	232	0.014	6.17	0.57
600	0.056	-0.942	238	0.043	18.25	1.98
700	0.046	-0.942	221	0.033	13.94	1.51
800	0.030	-0.937	200	0.017	7.46	0.81
1000	0.023	-0.932	229	0.010	4.41	0.48
1500	0.027	-0.932	206	0.013	5.92	0.64

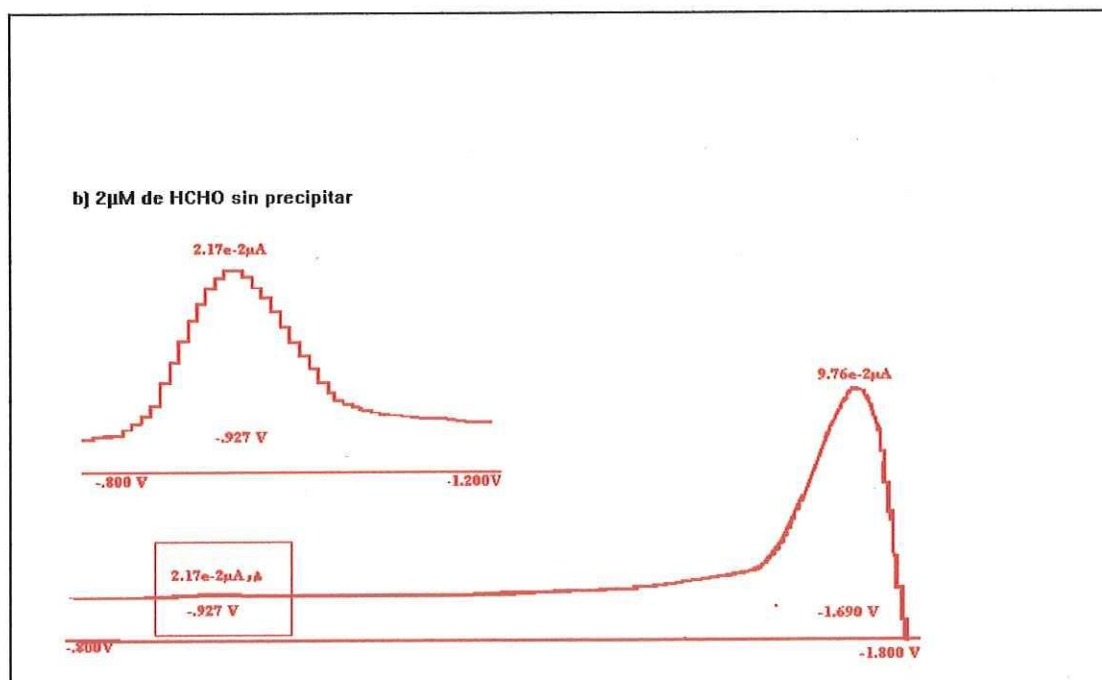
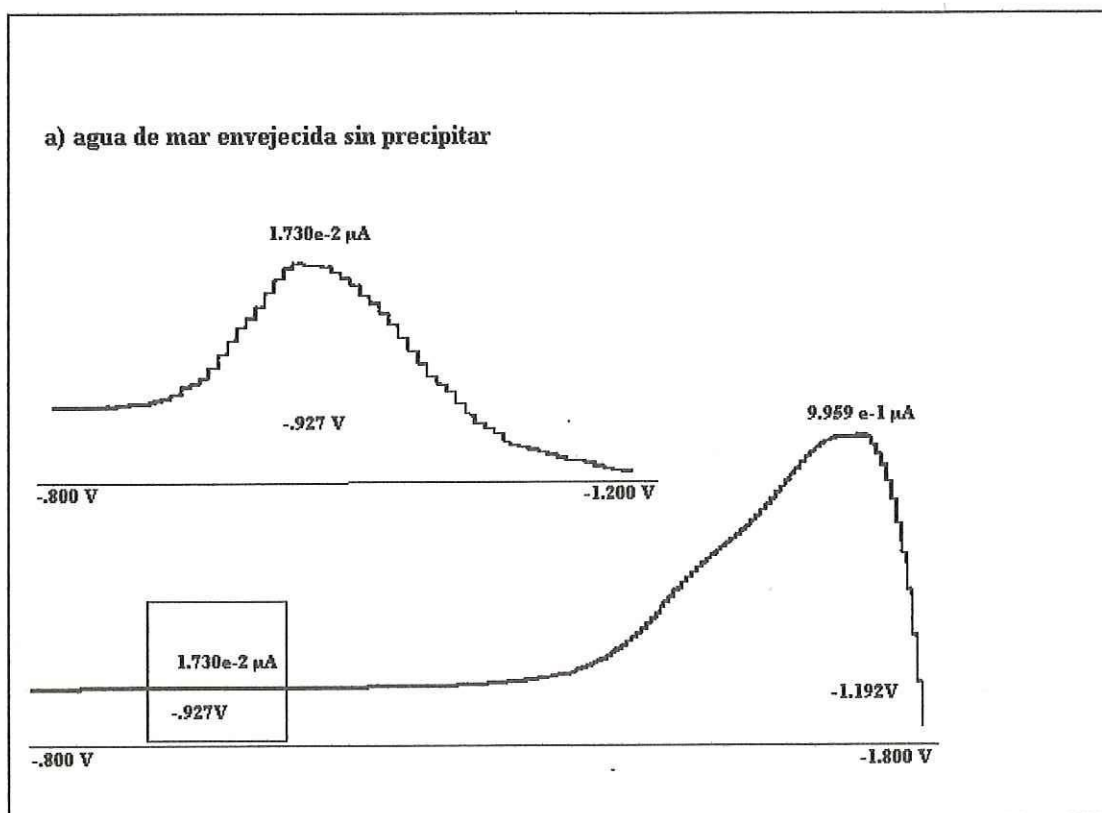


Figura 20 Agua de mar envejecida con AG-T y tratada con Chelex-100, utilizada para la coprecipitación y redisolución para concentrar la muestra. Concentración inicial de HCHO (a) y con 2 μM de HCHO (b). El recuadro se refiere al $E_{1/2}$ donde aparece la señal del HCHO, esta señal se encuentra ampliada en la gráfica superior del mismo inciso.

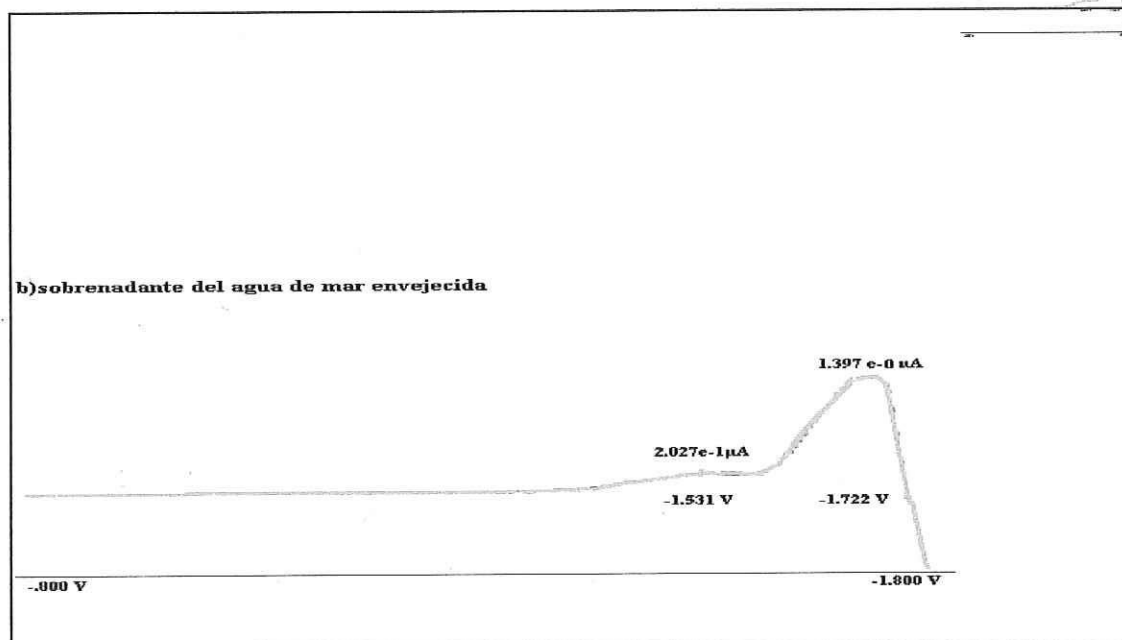
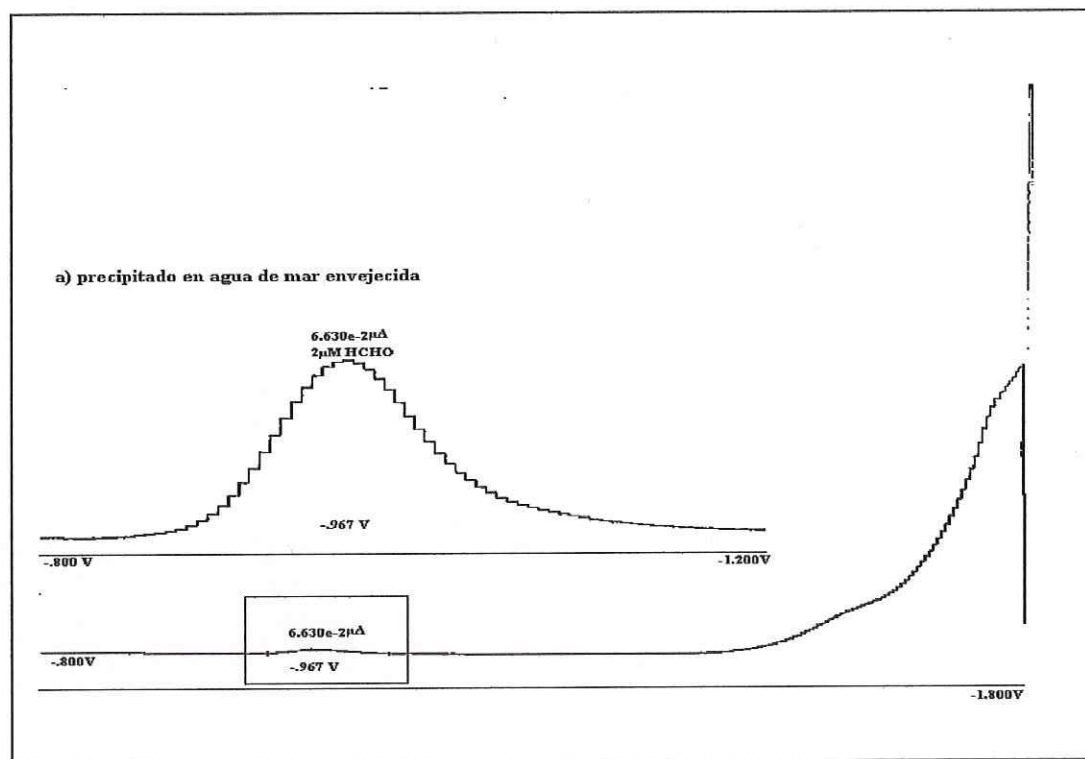


Figura 21 Polarogramas del precipitado(a) y sobrenadante (b) de la solución patrón de 2 μ M de HCHO en agua de mar envejecida. El recuadro se refiere al $E_{1/2}$ donde aparece la señal del HCHO, esta señal se encuentra ampliada en la gráfica superior del mismo inciso (a).

V DISCUSIONES.

La técnica propuesta produce resultados que son diferentes a los reportados por Igmanson (1997). Estas diferencias se hacen notorias en la magnitud de la corriente del blanco, la definición y variabilidad del $E_{1/2}$, y el límite de detección. El límite de detección reportado por Igmanson fue de $0.1 \mu\text{M}$ de HCHO, mientras que al reproducir su técnica se encuentran valores de $2.02 \mu\text{M}$ de HCHO. Las causas de estas discrepancias pudieron ser encontradas en el presente estudio y corregidas para proponer una técnica más depurada, sensible y reproducible.

Las condiciones que se deben cuidar durante el análisis de muestras para tener buena reproducibilidad y exactitud son el pH, el tiempo de reacción, el tiempo de almacenamiento y el uso de un electrolito de soporte adecuado para diluir los estándares.

Los valores de pH durante el análisis afectan la reproducibilidad y definición del $E_{1/2}$, ya que la forma de la señal del complejo HCHO-GT es muy amplia a valores de pH diferentes de 5. Por ello, es importante mantener el pH en un intervalo de 5 ± 0.1 . En estos valores de pH se obtiene una buena definición de la señal y por tanto buena reproducibilidad y resolución. Así mismo, la corriente de la señal del blanco se reduce hasta en un 25% a un pH de 5. Esto se puede comprender al revisar la reacción de reducción del complejo HCHO-GT, en la cual interviene la concentración de H^+ en la formación del complejo reducido (Smyth, 1979).

Otro factor importante son las posibles interferencias, por otros compuestos durante la reducción del complejo HCHO-GT (semicarbazona), ya que éstas influyen en la magnitud y forma de la señal. Lo anterior se refleja en las diferencias encontradas en los electrolitos de soporte utilizados (NaCl 0.5 M, agua de mar UV y agua de mar envejecida). Las principales diferencias se encontraron en la magnitud de la señal del HCHO entre la solución de NaCl y el agua de mar UV, manifestado en la pendiente de la regresión lineal de HCHO en μM contra corriente en μA (260 y 418.12 para el NaCl y el agua de mar UV, respectivamente). Esto nos indica que la señal es más débil en el agua de mar UV, debido probablemente a la interferencia con otros iones inorgánicos, principalmente, ya que la concentración de materia orgánica en el agua de mar irradiada con UV por 6h se supone nula (Armstrong *et. al.*, 1966). Por ello, debido a que estas

curvas de calibración fueron elaboradas con electrolitos de soporte tratados con CHELEX 100, nos sugiere que la posible interferencia negativa en el agua de mar sean aniones ya que las diferencias entre la solución de NaCl y el agua de mar UV se mantuvieron a lo largo de toda la curva de calibración. Los aniones probablemente reaccionan con el complejo HCHO-GT, produciendo que la señal sea menor en el agua de mar UV.

Por otra parte los resultados encontrados en las señales de los blancos, muestran que una posible interferencia importante sean iones metálicos. Al buscar los posibles metales que pueden dar una señal con la técnica de PPD se encuentra a 4 metales (plomo, cadmio, cobre y cinc), de los cuales, sólo el cinc puede reducirse a un potencial cercano al HCHO-GT; sin embargo las concentraciones naturales de este metal se encuentran en el orden de 10^{-9} M, por lo que su presencia en las muestras se debería a contaminación. En el tratamiento de los blancos con agentes quelantes, la corriente en todos los electrolitos de soporte disminuyó en más del 50 %, lo cual nos sugiere que una de las interferencias positivas es el cinc, esta interferencia puede disminuirse en forma apreciable al usar CHELEX-100. Sin embargo, sigue existiendo una señal de corriente de 0.01 a 0.03 μ A, mostrando que existen otro tipo de interferencias. Al comparar los resultados del agua de mar UV y el agua de mar envejecida se observa que los valores del blanco son más o menos de la misma magnitud. Esto nos sugiere una contaminación por formaldehído proveniente de la atmósfera, como ha sido reportado por otros autores (Eller, 1984; Kenneth et al., 1986; Tugrul, 1993). A pesar de ello, estas interferencias pueden corregirse al normalizar la magnitud de la corriente con el blanco.

Al tratar con los dos diferentes agentes quelantes se pudo observar que se obtienen mejores resultados con el CHELEX-100. Esto probablemente se deba a que el CHELEX se mantiene en forma sólida y no tiene posibilidades de reducirse. Por el contrario el EDTA (que es soluble) se puede reducir o bien, la estabilidad (o constante de estabilidad) con cada metal-EDTA y metal-CHELEX sea diferente y por ello, la señal del HCHO con EDTA se hace menos definida.

El tiempo de reacción es otro aspecto muy importante, que afecta la magnitud de la corriente de la señal del complejo G-T-HCHO y del blanco. Durante las primeras 4 horas la reacción no es completa ya que la corriente sigue aumentando con el tiempo.

Mientras que a mayor tiempo de reacción, la corriente se hace estable y se mantiene así por un tiempo que depende de la adición de un conservador (como el mercurio). Así mismo, la señal del blanco disminuye hasta valores de $0.012 \mu\text{A}$, con lo cual se obtiene un mejor límite de detección. En función de estos resultados se puede decir que el mejor conservador, por su manipulación, es el mercurio metálico ya que ofrece casi las mismas bondades que el Hg en forma iónica con la posibilidad de recuperación. Así mismo, se sugiere que se utilice sólo en el caso de que las muestras no puedan analizarse en un periodo de 7 días o que la temperatura ambiente sea mayor de 23°C .

La selectividad es un aspecto débil dentro de las técnicas polarográficas aplicadas a materia orgánica presente en agua de mar (Buffle, 1990). Por ello en este estudio se probó la resolución que tiene la técnica propuesta en identificar aldehídos de bajo peso molecular y otros grupos funcionales similares (cetonas y carboxilos). Los resultados mostraron que la capacidad resolutoria de esta técnica permite diferenciar entre aldehídos de bajo peso molecular, produciendo señales más negativas conforme aumenta el número de carbonos. Esto es razonable, ya que a valores de $E_{1/2}$ más negativos se traduce en una mayor energía libre de Gibbs (ΔG_R) y por tanto en un mayor requerimiento energético para su reducción. Sin embargo, no se pudieron encontrar diferencias significativas entre la señal del acetaldehído y el butiraldehído, ni aplicando un barrido de corriente más fina (0.001 V s^{-1}), lo cual nos indica que esta capacidad tiene sus limitaciones. Por otra parte, la selectividad de los aldehídos de otros grupos funcionales, se manifiesta en la comparación con polarogramas de acetona y carboxilo en agua de mar. Estos últimos no producen señal bajo las condiciones propuestas para la técnica, no obstante, se puede medir la concentración de acetona a un pH de 6 (Igmanson, 1997), el cual es diferenciable de los aldehídos por su potencial de reducción ($-1.25 \text{ V v.s. Ag/AgCl}$). Es importante mencionar que la capacidad de resolución es confiable en un 95% de confianza, ya que la distribución de $E_{1/2}$ para el HCHO fue normal y con una desviación estándar pequeña ($+ 0.015 \text{ V}$), tanto para el NaCl y el agua de mar UV. Esto nos indica que las interferencias por iones mencionada anteriormente sólo afecta la concentración pero no el valor del $E_{1/2}$. Lo cual implica que puede identificarse la señal con un alto nivel de confianza.

Al probar la técnica desarrollada en muestras de agua de mar naturales, se encuentran valores más altos en la zona costera (alrededor de $2\ \mu\text{M}$ de HCHO) que los reportados por Xiangliang y Mopper 1997 (2-24 nM). Esto tal vez se deba a la proximidad de zonas hoteleras aunado a que de forma regular durante 1997 ocurrieron eventos de marea roja; aunque el muestreo se realizó un mes después de la última marea roja (agosto). Estas aguas al ser impactadas por aguas residuales domésticas biológicamente tratadas producen un aumento de HCHO hasta $5\ \mu\text{M}$. Este valor es razonable si se considera que las aguas residuales contienen una gran variedad de compuestos orgánicos los cuales sufren cierta transformación por las bacterias presentes, durante un tratamiento biológico (Metcalf-Eddy, 1994).

Por otra parte aunque es la primera vez que se mide HCHO en el Golfo de California, y que se aplica la técnica aquí expuesta, los resultados nos permiten observar ciertos aspectos que coinciden con lo reportado por otros autores. Primeramente las concentraciones elevadas de HCHO en la superficie tal vez se deban a un enriquecimiento de este compuesto por aportes atmosféricos y a la fototransformación de la MOD, debido a la gran incidencia de luz y a que son aguas muy productivas (Xiangliang y Mopper, 1997). Así mismo, los máximos de HCHO encontrados a 600 y 700 m de profundidad, aunado a que se encuentran cercanos al mínimo de oxígeno, sugieren que la producción de HCHO tiene lugar en el océano por los procesos biológicos que se llevan a cabo en la columna de agua (Eberhard y Sieburth, 1985). Estos procesos de formación de HCHO, tal vez estén relacionados a la degradación de la materia orgánica presente. Sin embargo, cualquier conclusión derivada de los valores encontrados deben de tomarse con mucha cautela ya que el objetivo de analizar estas muestras, fue el de probar la técnica y verificar si existía un patrón de comportamiento con la profundidad. Debido a que los valores reportados eran menores al límite de detección encontrado aquí ($0.66\ \mu\text{M}$) fue necesario emplear una técnica de concentración para el análisis de estas muestras. La técnica de coprecipitación empleada permitió disminuir hasta en un orden de magnitud el límite de detección ($0.06\ \mu\text{M}$), así mismo, el porcentaje de recuperación fue mayor de 80%. Por ello, para detectar concentraciones por abajo de este nivel, es necesario pensar en una técnica de concentración alterna. Se propone usar la técnica desarrollada en este trabajo

con coprecipitación, pero empleando voltametría de adsorción con un electrodo de gota suspendida de mercurio, como la propuesta por Wing Hong y Tian Yao (1997), para agua dulce, esto permitirá determinar concentraciones nanomolares que podrán ser comparables con las técnicas cromatográficas y por tanto contribuirá con los conocimientos de los procesos heterotróficos en el océano.

VI CONCLUSIONES

La técnica de Igmanson (1997) fue modificada para su aplicación en agua de mar, obteniéndose un incremento en la resolución, precisión ($> 95\%$) y selectividad, con respecto a la técnica original.

Las modificaciones hechas en este trabajo permiten la detección de formaldehído hasta $0.66 \mu\text{M}$, el cual presenta un potencial de media onda de -0.94 V v.s. el electrodo de Ag/AgCl .

Los factores que deben controlarse durante el desarrollo del análisis de estos compuestos son:

pH de 5 que no debe variar en más de 0.1.

El tiempo óptimo de reacción que debe ser mayor de 4h.

Utilizar agua de mar natural libre de materia orgánica como electrolito de soporte para diluir los estándares.

El tiempo y las características de almacenamiento del complejo GT-HCHO ; ya que no es estable por periodos de tiempo prolongado ($> 48 \text{ h}$) a temperaturas $> 25^\circ\text{C}$ si no se emplea un conservador.

Utilizar el CHELEX-100 para quelar los metales presentes y aumentar la resolución de la señal.

Con esta técnica se puede diferenciar entre aldehídos de bajo peso molecular como formaldehído ($E_{1/2}$ de -0.94 V), acetaldehído ($E_{1/2}$ de -1.042 V) y benzaldehído ($E_{1/2}$ de -1.1 V), con un nivel de confianza del 95% .

La acetona sólo es detectable a pH 6 y el grupo de carboxilo no interfiere con la determinación de aldehídos, por lo cual la selectividad de este método es aceptable.

Las interferencias presentes en el agua de mar sólo influyen en la magnitud de la corriente del formaldehído sin afectar su $E_{1/2}$.

Las concentraciones de HCHO encontradas para aguas costeras cercanas a la FCM fueron de $2 \mu\text{M}$ y para aguas influenciadas por aguas residuales de $5 \mu\text{M}$.

La coprecipitación permite la disminución del límite de detección hasta en un orden de magnitud. Lo cual permitió la detección de formaldehído en el Golfo de California con máximos en la superficie ($1.8 \mu\text{M}$) y a 600-700 m de profundidad ($1.9 \mu\text{M}$).

Las máximas concentraciones de HCHO en aguas profundas están relacionados con el mínimo de oxígeno.

VII BIBLIOGRAFÍA

Armstrong, F.A.J., Williams, P.M. and Strickland, J.D.H, 1966. Photooxidation of organic matter in seawater by ultra-violet radiation, analytical and other applications. *Nature*, 211:481-483

Azam F. and J.W. Amernan 1984. Cycling of organic matter by bacterioplankton in pelagic marine ecosystem: Microenvironmental considerations. En: Fasham M.J.R. (Ed.), **"Flows Of Energy And Materials In Marine Ecosystems"**. Plenum Press, New York.

Bayona J.M., A.Farran and J. Albaiges, 1989. Steroid alcohols and ketones in coastal waters of Western Mediterranean: Sources and seasonal variability. *Mar. Chem.*, 27 (1-2) 79-104.

Benner R., J.D. Pakulsk, Mc. Carthy, J.I.Hedges y P.G. Hatcher, 1992. Bulk chemical characteristics of Dissolved Organic Matter in the Ocean. *Science*, 255(5051): 1561-1564

Buffle J., 1990. **Complexation Reactions In Aquatic Systems: an analytical approach**. Ellis Horwood. England. 692 p.

Carlson D.J., 1983. Dissolved organic materials in surface microlayer: Temporal and spatial variability and relation to sea state. *Limnol Oceanogr.* , 28(3):415-431.

Chevrolot L.,1991. Studies of dissolved carbohydrates (or carbohydrates like substances) in estuarine environment. *Mar.Chem.*, 32(1)19-35

Dekker M.(Editor), 1983. Formaldehyde, toxicology, epidemiology and mechanism. Formaldehyde Institute. N.Y., pp 138

Eberhard M.A. y McN. Sieburth 1985. A colorimetric procedure of the determination of aldehydes in sea water and in cultures of methylotrophic bacteria. *Mar. Chem.*, 17: 199-212.

Eller P. (editor), 1984. **"Formaldehyde Methods 3501"** NIOSH Manual Of Analytical Methods. US Department Health and Human Services: Cincinnati, OH.

Gómez-Moreno L.E., R. Cajal-Medrano y S.R. Canino-Herrera, 1997. Variación temporal de carbohidratos totales, polisacáridos, monosacáridos y actividad metabólica microbiana en el estero de punta Banda, México. *Ciencias Marinas*, 23(3):341-359

Igmanson D.L., 1997. Formaldehyde in hot springs. *Origins of Life and Evolution of Biosphere*, 27:313-317

Kieber D.J., J. McDaniel and K. Mopper, 1989. Photochemical source of biological substrates in sea water: Implications for carbon cycling. *Nature*, 341:637-339

Kieber Robert & Mopper Kenneth, 1990. Determination of Picomolar Concentrations Compounds in Natural Waters, Including Seawater, by Liquid Chromatography. *Environ. Sci. Technol.*, 24(10) 1477-1418.

Kimoto, T and Fujinaga, T. 1990. Synthesis of organic polymers on H₂S-rich seafloor: a possible reaction in the origin of life. *Mar.Chem.*, 30:179-192.

Lambert J., P. Burba y J. Buddrus, 1992. Quantification of partial structures in aquatic humic substances by volume integration of two-dimensional ¹³C nuclear magnetic resonance spectra. Comparison on one and two dimensional techniques. *Magn.-Resonance-Chem.*, 30 (3) pp. 221-227

Liebezeit G. y R. Dawson 1982. The analysis of natural organic compounds in sea water. En: Kontakte (merck), No 2, pp. 19-28.

Metcalf-Eddy, 1994. **Ingeniería sanitaria. Tratamiento, evacuación y reutilización de aguas residuales.** Labor, Barcelona pp 969

Mopper K. and W.L. Stahovec, 1986. Sources and sinks of low molecular weight organic carbonyl compounds in seawater. Marine Chemistry, 19:305-321.

Sawicki E., T.R. Hauser, T.W. Stanley and W. Elbert, 1961. The 3-metil-2-benzothiazolinone hydrazone test. Anal. Chem. Acta, 33:93-96

Sawicki E., T.W. Stanley and J. Praff, 1963. Spectrophotoflourometric determination of formaldehyde and acrolein wwith J-acid. Comparison with other methods. Anal. Chim. Acta, 28:156-163.

Smyth W.F., 1979. **Polarography Of Molecules Of Biological Significance.** Academic Press. N.Y. pp. 326.

Tugrul, S., 1993. Comparison of TOC concentrations by persulphate-UV and high-temperature catalytic oxidation techniques in the Marmara and Black Seas. Mar. Chem., 41: 265-270.

Vassos H.B. y E.W. Galen, 1987. **Electroquímica.** ed. Limusa pp303.

Wheeler O.H., 1968. The Girad-reagents. Journal of Chemical Education, 45:205-220

Williams P.M. y Zirino A, 1964. Scaveging of disolved organic matter from seawater with hydrated metal oxides. Nature, 20: 44-62

Wing Hong Chang and Tian Yao Xie, 1997. Adsorption voltametric determination of $\mu\text{g l}^{-1}$ levels formaldehyde via in situ derivatization with Girard's reagent T, *Analytical Chimica Acta*, 339:173-179.

Xianliang Z. y K. Mopper, 1997. Photochemical production of low-molecular-weight carbonyl compounds in seawater and surface microlayer and their air-sea exchange. *Mar. Chem.*, 56:201-213.

Zafiriou O.C., J. Alford, M.Herrera, E.T. Eltzer and R.B. Gagosian, 1980. Formaldehyde in remote marine air and rain: Flux measurement and estimates. *Geophysical Research*, 7(5):341-344.

Zhou X. and K. Mopper, 1997. Photochemical production of low-molecular-weight carbonyl compounds in seawater and surface microlayer and their air-sea exchange. *Marine Chemistry*, 56:201-213.

Ziechman W. , 1988. Evolution of structural models from consideration of physical and chemical properties. En: F.H.Frimmel and R.F. Christman. **Humic Substances And Their Role In The Environment**. John Wiley and Sons Publishers. pp. 113-132