



Aplicación de técnicas voltamperométricas con electrodos serigrafiados a la especiación de metales pesados en muestras naturales

Velia Ruth Sosa Gómez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



Programa de doctorado

Química Analítica del Medio Ambiente y la Polución

Memoria presentada por

Velia Ruth Sosa Gómez

**Aplicación de técnicas voltamperométricas con
electrodos serigrafiados a la especiación de
metales pesados en muestras naturales**

Para optar al grado de

Doctora por la Universitat de Barcelona

Dirección

Dra. Cristina Ariño Blasco

Universitat de Barcelona
Departament de Química Analítica

Dra. Núria Serrano i Plana

Universitat de Barcelona
Departament de Química Analítica

Programa de doctorado

Química Analítica del Medio Ambiente y la Polución

Memoria presentada por

Velia Ruth Sosa Gómez

Aplicación de técnicas voltamperométricas con electrodos serigrafiados a la especiación de metales pesados en muestras naturales

La Dra. Cristina Ariño Blasco y la Dra. Núria Serrano i Plana

CERTIFICAN

que la presente tesis doctoral, titulada "***Aplicación de técnicas voltamperométricas con electrodos serigrafiados a la especiación de metales pesados en muestras naturales***" ha sido realizada por la Sra. Velia Ruth Sosa Gómez bajo nuestra dirección en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, abril de 2015

Dra. Cristina Ariño Blasco

Profesora titular del Departament de Química
Analítica de la Universitat de Barcelona.

Dra. Núria Serrano i Plana

Profesora ayudante doctor del Departament de Química
Analítica de la Universitat de Barcelona.

A mi familia por su amor y apoyo

**Aplicación de técnicas voltamperométricas con
electrodos serigrafiados a la especiación de
metales pesados en muestras naturales**

CONTENIDO

Objetivos	v
Estructura y contenidos de la memoria	vii
Resumen	xi
Abreviaturas y acrónimos	xiii
I. INTRODUCCIÓN	3
1. Metales pesados	3
1.1. Cadmio	6
1.2. Plomo	8
1.3. Cobre	10
1.4. Mercurio	10
2. Interés de la determinación de metales pesados	13
3. Técnicas voltamperométricas para la determinación de metales pesados	17
3.1. Electroodos de trabajo basados en materiales diferentes del mercurio	20
3.2. Preparación de las películas	27
3.3. Electroodos serigrafiados	29
3.4. Estado actual de las investigaciones con electroodos serigrafiados de bismuto y antimonio	35
3.4.1. Electroodos serigrafiados modificados con bismuto	35
3.4.2. Electroodos serigrafiados modificados con antimonio	39
II. TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS Y QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS	43
4. Técnicas voltamperométricas	43
4.1. Voltamperometría diferencial de impulsos	45
4.2. Voltamperometría cíclica	47
4.3. Técnicas de redisolución	48
5. Electroodos de trabajo	53

6. Técnicas quimiométricas	55
6.1. Resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)	55
6.2. Restricciones	58
6.3. Metodologías MCR para el tratamiento de datos no lineales	61
III. EXPERIMENTAL	65
7. Instrumentación y reactivos	65
7.1. Instrumentación	65
7.2. Reactivos	66
8. Procedimientos experimentales	69
8.1. Preparación de los electrodos serigrafiados de bismuto y antimonio	69
8.2. Electrodo de bismuto sputtered como otra alternativa de modificación de electrodos de bismuto en la determinación de iones cadmio y plomo en aguas subterráneas	73
8.3. Estudio de la determinación de los iones Pb(II) y Cd(II) en agua de pozos usando un Bi _{sp} SPE	73
8.4. Estudio de complejación utilizando un electrodo serigrafiado de carbono modificado con bismuto	74
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	79
9. Presentación de resultados de la aplicación de electrodos serigrafiados de bismuto en la determinación de metales pesados en muestras naturales y en estudios de complejación	79
9.1. Sputtered bismuth screen-printed electrode: A promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in ground water	83
9.2. Voltammetric determination of Pb(II) and Cd(II) ions in well water using a sputtered bismuth screen-printed electrode	91
9.3. Can bismuth film screen printed carbon electrodes be used to study complexation?	99
9.4. Discusión de resultados	107

9.4.1. Aplicación de electrodos serigrafiados de bismuto en la determinación de metales pesados en muestras naturales	107
9.4.2. Estudio de complejación	114
10. Aplicación de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con antimonio a la determinación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en muestras naturales con DPASV	121
10.1. Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples	123
10.2. Discusión de resultados	133
V. Conclusiones	145
VI. Bibliografía	149
Agradecimientos	163

Objetivos

La necesidad de desarrollar dispositivos electródicos desechables y aptos para medidas con instrumentación portátil, ha llevado a considerar los electrodos serigrafiados modificados con bismuto o antimonio como dispositivos adecuados para la determinación de iones metálicos mediante técnicas voltamperométricas.

Así, el objetivo principal de esta tesis es el estudio de la viabilidad analítica de nuevos dispositivos electródicos como son los electrodos serigrafiados, modificados con bismuto o antimonio como materiales alternativos al mercurio, en la determinación de metales pesados (Cd(II) , Pb(II) y Cu(II)) en muestras de interés medioambiental. Igualmente se ha considerado su aplicabilidad en estudios de complejación metal-ligando.

Para conseguir este objetivo principal, en primer lugar se deben caracterizar microscópicamente y analíticamente los diferentes electrodos serigrafiados modificados para posteriormente comparar su comportamiento aplicándolos al estudio de metales pesados en un material de referencia y en una muestra natural.

Estructura y contenidos de la memoria

El principal interés de esta tesis es el desarrollo y aplicabilidad de electrodos serigrafiados modificados con bismuto o antimonio para la determinación de metales pesados en muestras naturales por lo que la primera parte de la memoria (**Introducción**) está dedicada a la importancia del estudio de los metales pesados en el medio ambiente. En el **Capítulo 1** se enumeran las principales fuentes de contaminación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II), su toxicidad y los efectos sobre la salud humana. En el **Capítulo 2** se resalta el interés del estudio de los metales pesados y se concretan las metodologías analíticas para la determinación de éstos. En el **Capítulo 3** se presentan las técnicas voltamperométricas como unas técnicas muy convenientes para la determinación de metales pesados en muestras ambientales, se consideran los electrodos de mercurio, y se introducen los electrodos de trabajo basados en materiales diferentes del mercurio. En este apartado se presentan los métodos de obtención de películas de bismuto o antimonio, y se introducen los electrodos serigrafiados como una opción a los electrodos más tradicionales. En este mismo capítulo se muestra el estado de las investigaciones en las que se utiliza bismuto o antimonio como material electródico.

En la segunda parte (**Técnicas voltamperométricas y quimiométricas utilizadas**) que está dividida en tres capítulos, se describen las técnicas voltamperométricas utilizadas en esta tesis (**Capítulo 4**), se especifican los diferentes electrodos de trabajo utilizados (**Capítulo 5**) y se introducen las técnicas quimiométricas utilizadas para el estudio de complejación **Capítulo 6**.

En la tercera parte (**Experimental**) se presenta la parte experimental, la cual engloba la instrumentación y los reactivos utilizados (**Capítulo 7**) y el procedimiento experimental para la preparación de los electrodos serigrafiados de carbono modificados con Bi(III) o Sb(III) (**Capítulo 8**). En esta parte también se incluye el procedimiento seguido en el análisis de metales en el material de referencia y en las muestras naturales, y el procedimiento seguido en el estudio de complejación.

En la cuarta parte (**Resultados y discusión**) se presentan los resultados obtenidos y la discusión de los mismos organizándolos en dos capítulos (**Capítulo 9 y Capítulo 10**):

- En el **Capítulo 9** se presentan y se discuten los resultados de los estudios que se han llevado a cabo utilizando electrodos serigrafiados modificados con bismuto que incluyen su caracterización y la aplicación a la determinación de Cd(II) y Pb(II) en un material certificado (agua subterránea) y en muestras de aguas de pozo. Estos estudios han dado lugar a las publicaciones 1 y 2 que se indican a continuación.
- Dentro del capítulo 9 también se presenta la aplicación de un dispositivo *ex-situ* BiSPCE en estudios de complejación y se comentan las posibilidades de estos dispositivos en este tipo de estudios. Los resultados obtenidos dieron lugar a la publicación 3 que se indica a continuación.
- En el **Capítulo 10** se presentan y discuten los resultados obtenidos en el estudio en que se consideran los electrodos serigrafiados modificados con antimonio, así como su aplicación en la determinación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en un material certificado (agua subterránea). Los resultados obtenidos dieron lugar a la publicación 4 que se detalla a continuación.

Los trabajos presentados en la memoria de la tesis son:

1. *Sputtered bismuth screen-printed electrode: A promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in ground water.*

Autores: Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban.

Talanta 119 (2014) 348–352.

2. *Voltammetric determination of Pb(II) and Cd(II) ions in well water using a sputtered bismuth screen-printed electrode.*

Autores: Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban.

Electroanalysis 2014, 26, 2168 – 2172.

3. *Can bismuth film screen printed carbon electrodes be used to study complexation?*

Autores: Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban.

Talanta 107 (2013) 356–360.

4. *Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples.*

Autores: Velia Sosa, Cristian Barceló, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban.

Analytica Chimica Acta 855 (2015) 34–40.

En la última parte de la memoria se presentan las conclusiones (**Conclusiones**) a las que se han llegado considerando los resultados obtenidos en esta Tesis, para terminar con las referencias bibliográficas consultadas (**Bibliografía**).

Resumen

El principal objetivo de esta Tesis es el estudio de la viabilidad analítica de nuevos dispositivos electródicos como son los electrodos serigrafiados modificados con bismuto o antimonio como materiales alternativos al mercurio en la determinación y especiación de metales pesados mediante técnicas voltamperométricas.

La tecnología del serigrafiado permite la fabricación de dispositivos económicos y desechables de sistemas electródicos como alternativa a los electrodos clásicos que se pueden adaptar a instrumentación portátil. Los electrodos serigrafiados (SPEs), pueden ser modificados con metales como el bismuto o el antimonio por métodos de electrodeposición vía *in-situ* o *ex-situ*, utilizando una solución de Bi(III) o de Sb(III); también pueden modificarse a través de un precursor metálico, o se puede obtener mediante la técnica de *sputtering*.

Por otro lado existe un creciente interés en la búsqueda de materiales electródicos alternativos del mercurio, menos tóxicos que éste pero con un comportamiento electroquímico similar (amplio rango catódico de trabajo, sensibilidad y reproducibilidad), especialmente para cumplir con las crecientes demandas de dispositivos para monitoreo ambiental *in-situ* de metales pesados. Entre estos materiales, el bismuto y más recientemente el antimonio han demostrado tener un comportamiento analítico adecuado que los hace aparecer como una alternativa en la determinación de metales pesados mediante técnicas voltamperométricas.

Para conseguir los objetivos planteados se han realizado diversos estudios que se comentan a continuación. En primer lugar se presentan los resultados obtenidos cuando se utilizan BiSPEs. Se caracterizan los dispositivos considerados (*ex-situ* BiSPCE, *in-situ* BiSPCE, Bi_{Ox}SPCE y Bi_{sp}SPE) tanto física como analíticamente, se compara el comportamiento de los diferentes dispositivos entre ellos y el electrodo de gotas de mercurio y se aplican estos dispositivos a la determinación de Cd(II) y Pb(II) en un material de referencia (agua subterránea) y en aguas de pozo de El Salvador. Los BiSPEs demostraron ser una alternativa a los electrodos de mercurio en la determinación de estos metales. Además, de entre estos electrodos se presenta al BiSPE obtenido por técnicas de *sputtering* como una alternativa ventajosa a los BiFEs y a los

BiSPCEs obtenidos modificando un SPCE vía *in-situ* o *ex-situ*, debido a que no es necesario ningún tratamiento antes del análisis de la muestra ya que presentan unos LOD muy favorables. El electrodo Bi_{sp}SPE demostró tener un comportamiento analítico similar al del HMDE en la determinación de Cd(II) y Pb(II) en muestras de aguas de pozos. En esta Tesis se ha utilizado por primera vez un electrodos serigrafiados de carbono modificados con bismuto vía *ex-situ* en estudios de complejación; en concreto se han estudiado las interacciones del Cd(II) con ligandos de interés medioambiental por voltamperometría de impulsos diferencial y técnicas quimiométricas para el tratamiento de los datos. Estos dispositivos han demostrado ser una alternativa a los electrodos de mercurio y a los de película de bismuto en este tipo de estudios.

En segundo lugar se han estudiado las posibilidades que presentan los electrodos serigrafiados modificados con antimonio en la determinación de metales pesados. En concreto se ha considerado un SPCE modificado vía *in-situ* y se ha aplicado a la determinación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en un material certificado (agua subterránea). Este dispositivo demostró ser una opción al *in-situ* BiSPCE para la determinación de estos metales en particular para el Cu(II), no solo por presentar un menor LOD para este metal, sino porque no se observa competencia entre el Sb(III) y Cu(II) por depositarse en la superficie del electrodo.

Como resultado de los estudios de investigación llevados a cabo en esta Tesis, se han publicado cuatro artículos en diferentes revistas científicas. Estas publicaciones son la base del trabajo expuesto en esta Tesis.

Abreviaturas y acrónimos

Acrónimos		
Alternating current polarography	ACP	Polarografía de corriente alterna
Adsorptive stripping voltammetry	AdSV	Voltamperometría de redisolución con etapa previa de adsorción
Alternating least squares	ALS	Mínimos cuadrados alternados
Anodic stripping voltammetry	ASV	Voltamperometría de redisolución anódica
Bismuth screen printed carbón electrodes	BiSPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono modificados con bismuto
Bismuth film electrode	BiFE	Electrodo de película de bismuto
Bismuth (III) oxide modified screen printed carbon electrode	Bi _{ox} SPCE	Electrodo serigrafiado de carbono modificado con óxido de bismuto (III)
Glassy carbon bismuth antimony electrode	Bi-SbGC	Electrodo de carbono vitrificado con película de bismuto y antimonio
Bismuth screen printed electrodes	BiSPEs	Electrodos serigrafiados de bismuto
Sputtered bismuth screen printed electrode	Bi _{sp} SPE	Electrodo serigrafiado modificado por pulverización catódica (o vía <i>sputtering</i>) con bismuto
Cathodic stripping voltammetry	CSV	Voltamperometría de redisolución catódica
Cyclic voltammetry	CV	Voltamperometría cíclica
Direct current polarography	DCP	Polarografía de corriente continua
Dropping mercury electrode	DME	Electrodo de gotas de mercurio
Differential pulse anodic stripping voltammetry	DPASV	Voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos
Differential pulse polarography	DPP	Polarografía diferencial de impulsos
Differential pulse voltammetry	DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos
Deposition potential	E _d	Potencial de deposición
Enzyme-linked immunosorbent assay	ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
High performance liquid chromatography with electrothermal atomic absorption spectrometry	ETAAS-HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución con espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica
<i>Ex-situ</i> antimony modified screen printed carbon electrode	<i>ex-situ</i> SbSPCE	Electrodo serigrafiado de carbono modificado ex-situ con antimonio

<i>Ex-situ</i> bismuth modified screen printed carbon electrode	<i>ex-situ</i> BiSPCE	Electrodo serigrafiado de carbono modificado <i>ex-situ</i> con bismuto
Field emission scanning electron microscopy	FESEM	Microscopía electrónica de barrido efecto campo
Flow injection analysis	FIA	Análisis por inyección en flujo
Glassy carbon	GC	Carbono vitrificado
Gaussian peak adjustment	GPA	Ajuste de pico gaussiano
Hanging mercury drop electrode	HMDE	Electrodo de gota colgante de mercurio
High performance liquid chromatography	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Anodic current	i_{an}	Corriente anódica
Cathodic current	i_{ca}	Corriente catódica
Inductively coupled plasma atomic emission spectrometry	ICP-AES	Espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente
Inductively coupled plasma mass spectrometry	ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente
<i>In-situ</i> bismuth modified screen printed carbon electrode	<i>in-situ</i> BiSPCE	Electrodo serigrafiado de carbono modificado <i>in-situ</i> con bismuto
<i>In-situ</i> antimony modified screen printed carbon electrode	<i>in-situ</i> SbSPCE	Electrodo serigrafiado de carbono modificado <i>in-situ</i> con antimonio
Peak current	i_p	Corriente de pico
Limits of detection	LODs	Límites de detección
Lack of fit	lof	Falta de ajuste
Limits of quantification	LOQs	Límites de cuantificación
Linear sweep anodic stripping voltammetry	LSASV	Voltamperometría de barrido lineal con redisolución anódica
Linear sweep voltammetry	LSV	Voltamperometría de barrido lineal
Multivariate curve resolution	MCR	Resolución multivariante de curvas
Multivariate curve resolution by alternating least squares	MCR-ALS	Resolución multivariante de curvas por mínimo cuadrados alternados
Mercury film electrode	MFE	Electrodo de película de mercurio
Mass spectrometry	MS	Espectrometría de masas
Multi-syringe flow injection analysis	MSFIA	Análisis de multi - jeringa de inyección por flujo

Multi-walled carbon nanotubes	MWCNTs	Nanotubos de carbono multicapa
Normal pulse polarography	NPP	Polarografía de impulsos normal
Parametric signal fitting	PSF	Ajuste paramétrico de señales
	rpm	Revoluciones por minuto
Relative standard deviation	RSD	Desviación estándar relativa
Antimony film electrode	SbFE	Electrodo de película de antimonio
Antimony film microelectrode	SbFME	Microelectrodo de película de antimonio
Antimony modified screen printed carbon electrodes	SbSPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono modificados con antimonio
Antimony modified screen printed electrodes	SbSPEs	Electrodos serigrafiados modificados con antimonio
Sputtered antimony screen printed electrode	Sb _{Sputtered} SPE	Electrodo serigrafiado modificado con antimonio por pulverización catódica
Stripping chronopotentiometric	SCP	Cronopotenciometría de redisolución
Static mercury drop electrode	SMDE	Electrodo de gotas de mercurio estacionario
Screen printed carbon electrodes	SPCEs	Electrodos serigrafiados de carbono
Screen printed electrodes	SPE	Electrodos serigrafiados
Stripping voltammetry	SV	Voltamperometría de redisolución
Singular value decomposition	SVD	Descomposición en valores singulares
Square wave anodic stripping voltammetry	SWASV	Voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica
Square wave voltammetry	SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
Deposition time	t_d	Tiempo de deposición
Rest time	t_r	Tiempo de reposo
Stripping time	t_s	Tiempo redisolución

I

INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. Metales pesados

El término “metal pesado” engloba a aquellos metales de la tabla periódica cuyo peso específico es superior a 7 g cm^{-3} o que tienen un peso atómico superior a 20, excluyendo metales alcalinos y alcalinotérreos. Sin embargo este término resulta impreciso considerando las propiedades físico-químicas de los elementos, motivo por el cual se han propuesto términos como “metal tóxico” o “elemento traza” resultando igualmente poco satisfactorios. Aun así, el término “metal pesado” se puede utilizar de forma general para referirse a metales clasificados como contaminantes ambientales.

Entre los metales pesados se pueden encontrar elementos esenciales y no esenciales para los seres vivos. Aunque no existe un límite definido entre ellos, normalmente se reconocen como elementos esenciales el Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo, como elementos beneficiosos el Ni y Cr, y como elementos no esenciales los que no tienen ninguna función biológica, el Cd, Pb, Hg y As. Todos los metales pesados, esenciales o no, pueden llegar a ser tóxicos cuando se aportan en exceso. Una característica importante de los metales pesados es que no son degradables, por lo cual se acumulan en los sistemas ambientales siendo los últimos sumideros de los metales pesados los suelos y los sedimentos [1–3].

Algunos de los metales pesados forman parte de los contaminantes elementales del medio ambiente y son de interés debido a su toxicidad para los humanos. El término contaminantes elementales se refiere a los elementos traza, es decir los elementos que se encuentran a niveles de mg L^{-1} o menos en un sistema del medio ambiente. En la Tabla 1 se muestra una lista de los elementos traza que se han encontrado en las aguas naturales, algunos de ellos son esenciales a bajos niveles pero tóxicos a niveles altos, como es el caso del Cu [1]. En esta tabla se muestran tanto metales pesados como otros elementos.

La toxicidad de los metales pesados depende mucho de la forma química del elemento, es decir de su especiación. Por ejemplo, el vapor de mercurio es altamente tóxico, mientras que el Hg como elementos libre en su forma condensada, así como el Pb y el Cd, no son tóxicos, pero son peligrosos en forma catiónica y también enlazados a cadenas cortas de átomos de carbono [4].

Tabla 1. Elementos traza importantes encontrados en aguas naturales [1].

ELEMENTOS	FUENTES	EFFECTOS
Arsénico	Subproductos mineros residuales químicos	Tóxico, posible carcinogénico
Berilio	Carbón, energía nuclear, residuos industriales	Toxicidad grave y crónica, posible carcinogénico
Boro	Carbón, detergente, residuos industriales	Tóxico para algunas plantas
Cadmio	Descargas industriales, desechos de minería, recubrimientos metálicos, tuberías de agua	Reemplaza al zinc bioquímicamente, causa aumento de la presión sanguínea, daño en los riñones, destruye el tejido testicular y los glóbulos rojos; tóxico para la biota acuática
Cobre	Recubrimientos metálicos, minería, residuos industriales	Elemento traza esencial, no muy tóxico para animales, tóxico para las plantas y para las algas a niveles altos
Cromo	Recubrimientos metálicos, aditivo en torres de enfriamiento, normalmente se encuentra como Cr(VI) en aguas contaminadas	Elemento traza esencial como Cr(III), tóxico posible carcinogénico como Cr(VI)
Flúor	Fuentes geológicas naturales, residuos industriales, como aditivo en agua	Previene la caída de los dientes a aproximadamente 1 mg L ⁻¹ . Tóxico a niveles superiores, puede causar fluorosis dental o daño en los huesos a concentraciones alrededor de 5 mg L ⁻¹
Hierro	Residuos industriales, corrosión, agua ácida de minas, minerales de hierro	Nutriente esencial, daña materiales (baños, ropa, etc.) formando manchas
Manganeso	Residuos industriales, drenajes o aguas ácidas de las minas, acción microbiana	Tóxico para las plantas
Mercurio	Residuos industriales, minería y carbón	Tóxico, se moviliza como compuestos metilados de mercurio por bacterias anaerobias
Molibdeno	Residuos industriales, fuentes naturales	Esencial para las plantas, tóxico para los animales
Plomo	Residuos industriales, minería, combustibles	Tóxico, dañino para la fauna
Yodo	Residuos industriales, salmueras naturales, intrusiones salinas	Previene el bocio
Selenio	Fuentes naturales, carbón	Esencial a bajos niveles, tóxico a niveles superiores
Zinc	Residuos industriales, recubrimientos de metales	Elemento esencial, tóxico para las plantas a altos niveles

En general los cationes de los metales pesados tienen afinidad por el azufre. Los grupos sulfhidrilo ($-SH$) presentes en las enzimas, cuya función es contrarlar la velocidad de las reacciones metabólicas críticas en el cuerpo humano, son enlazados por los cationes metálicos ingeridos o las moléculas que contienen los metales, haciendo que no puedan actuar normalmente, afectando a la salud humana. Los grupos carboxílico ($-COOH$) y amino ($-NH_2$) de las proteínas también pueden formar enlaces químicos con los metales pesados. Así, los iones Cd^{2+} , Pb^{2+} , Cu^{2+} y Hg^{2+} se enlazan a las membranas celulares, dificultando el proceso de transporte a través de la pared celular.

A pesar que los metales pesados pueden contaminar tanto el agua como los suelos y los alimentos, éstos se transportan mayoritariamente a través del aire, como gases o como especies absorbidas en las partículas materiales suspendidas. La deposición de plomo en los sedimentos de lagos europeos data de la época de los antiguos griegos, debido a que la plata que se producía en masa para ser utilizada en las monedas contenía cantidades importantes de plomo. Se cree que el plomo que contaminaba la plata cruda pasaba al aire durante el refinado del metal [4].

El problema relacionado con los metales pesados es la bioacumulación que se refiere a la capacidad que tienen los compuestos químicos de acumularse en los tejidos de los organismos vivos. Esta acumulación puede implicar cantidades aparentemente pequeñas pero que recibidas durante largos periodos de tiempo pueden alcanzar niveles tóxicos [4,5]. Aunque los metales pesados pueden acumularse en los organismos, únicamente el mercurio tiene la capacidad de biomagnificarse.

La biomagnificación es un proceso en el cual un compuesto químico aumenta su concentración a lo largo de una cadena alimenticia. En esencia la biomagnificación es el resultado de una secuencia de etapas de bioacumulación que tienen lugar a lo largo de la cadena trófica [4].

En esta tesis se han considerado los metales Cd, Pb y Cu como analitos a determinar, debido a su amplio uso, a su toxicidad y a su amplia distribución en el medio, y de manera indirecta se considera el Hg que puede ser utilizado como material electrodico.

1.1. Cadmio

Las principales fuentes de contaminación por cadmio son las descargas industriales y urbanas, los desechos de minas, la quema de carbón, los tratamientos por incineración de residuos que contienen cadmio como las baterías de níquel–cadmio, los pigmentos (el CdS y el CdSe utilizados para dar color a plásticos), la utilización agrícola de fertilizantes fosfatados, los lodos residuales y la deposición atmosférica de cadmio en los suelos [1,4]. En la Figura 1 se muestra un esquema del ciclo biogeoquímico del cadmio, donde se puede ver su distribución en los diferentes compartimentos o esferas del medio ambiente.

El ion Cd^{2+} es bastante soluble en agua (excepto en presencia de iones sulfuro que forma el precipitado de CdS), sin embargo los seres humanos reciben sólo una pequeña cantidad de forma directa a partir del agua de consumo o del aire, excepto las personas que viven cerca de minas o de fundiciones de zinc, y las personas fumadoras que lo reciben a través del tabaco. En general la mayor exposición de los humanos al cadmio es a través de la alimentación, los mariscos y la carne de órganos, particularmente los riñones poseen los mayores niveles de cadmio (100 mg L^{-1} o más) respecto a otros alimentos. El cadmio de la dieta proviene mayoritariamente de las patatas, trigo, arroz y otros granos debido a su mayor consumo comparado con el de carnes y mariscos.

Los seres humanos están protegidos contra la exposición a niveles bajos de cadmio y a otros metales pesados por la proteína metalotioneína, la cual posee en su estructura un número elevado de grupos sulfhidrilo, por lo que tiene la capacidad de complejar a los iones Cd^{2+} . Sin embargo si la cantidad de cadmio absorbida por el organismo excede la capacidad de síntesis de complejación de estas moléculas, el metal puede afectar a la salud. Estas moléculas no son sólo características del ser humano, sino que también son sintetizadas por otros mamíferos. En el caso de plantas, algas y algunos hongos frente a la acción de metales pesados se sintetizan otras moléculas que también tienen grupos sulfhidrilo, que son las fitoquelatinas.

Aunque el cadmio no se biomagnifica, es un tóxico acumulativo, ya que si no es eliminado por el metabolismo puede durar décadas en el organismo [4].

Los efectos del envenenamiento agudo del cadmio en humanos son muy serios. Entre los efectos más relevantes se encuentran un aumento de la presión sanguínea, daños en el riñón, destrucción del tejido testicular y destrucción de los eritrocitos. El ion Cd^{2+}

puede sustituir al ion Ca^{2+} de los huesos pudiendo producir la enfermedad conocida por el nombre “itai-itai”. Esta enfermedad vuelve porosos los huesos lo que hace que puedan fracturarse. El cadmio está ubicado en la tabla periódica en el mismo subgrupo del zinc y mercurio, pero es más similar al zinc; su único ion, al igual que para el zinc es el ion +2. Se piensa que la acción fisiológica del cadmio se debe a su similitud química con el zinc. El cadmio puede reemplazar al zinc en algunas enzimas, alterando la estereoestructura de la enzima y deteriorando su actividad catalítica [1,4].

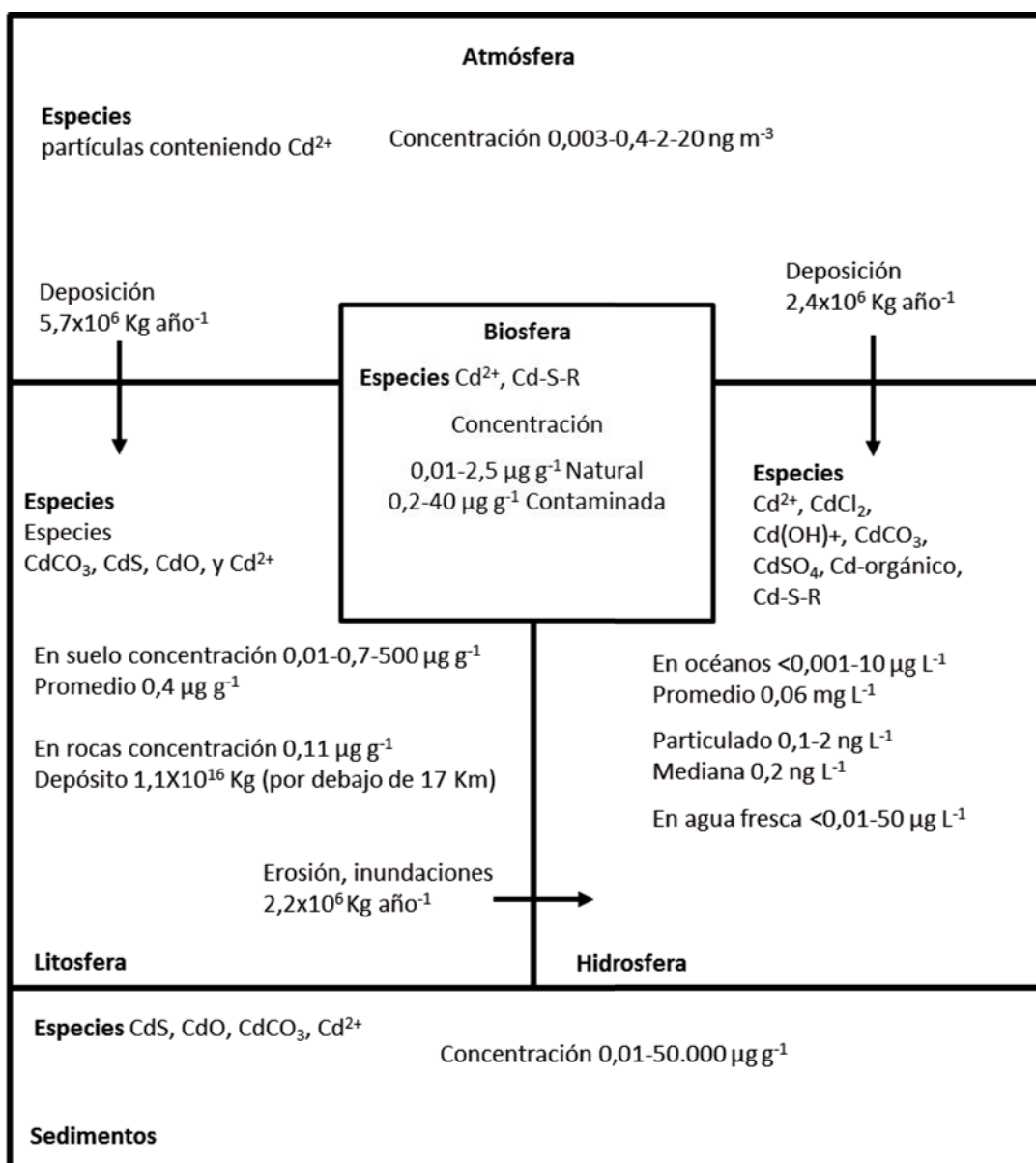


Figura 1. Ciclo biogeoquímico del cadmio. Contribuciones externas hacia la atmósfera: combustión de carbón y de petróleo, producción de cemento, industria. A la litosfera/hidrosfera: galvanoplastia, fertilizantes fosfatados, pigmentos, aguas residuales, aguas pluviales. Adaptado de [6].

1.2. Plomo

La exposición humana al plomo puede ocurrir a través del aire, del suelo o de la materia en suspensión, a través del agua de consumo humano y de los alimentos. Sin embargo, el medio de dispersión más importante de plomo es a través del aire, debido a que las partículas que contienen plomo proveniente de fuentes antropogénicas pueden viajar grandes distancias antes de sedimentarse por vía húmeda, por vía seca o por deposición en las nubes. La deposición de plomo será más intensa cerca de la zona donde se encuentra la fuente, sin embargo, el área de deposición puede llegar a extenderse a varios kilómetros de distancia de la fuente [7].

El plomo representa un importante problema ambiental cuando se disuelve para dar la forma iónica. En la Figura 2 se muestra de manera esquemática el ciclo biogeoquímico del plomo, en el que se puede ver su distribución en las diferentes esferas del medio ambiente.

Desde la antigüedad el plomo se utilizó como material estructural; los romanos lo utilizaron en acueductos y para utensilios de cocina. Más adelante se ha utilizado en la industria de la construcción para techado, para insonorización; también se utiliza en electrónica, como aditivo para pinturas, en gasolina, en munición de plomo que se utiliza para cacería de aves. Otra fuente importante de contaminación por plomo proviene de las baterías de plomo, ya que durante el reciclado el plomo puede escapar al medio ambiente.

El plomo puede formar compuestos tetravalentes orgánicos, entre los más importantes están los formados con el grupo metilo (CH_3 -) y el etilo (CH_2CH_3 -), dando lugar al $\text{Pb}(\text{CH}_3)_4$ y al $\text{Pb}(\text{C}_2\text{H}_5)_4$ respectivamente. En el pasado, ambos compuestos fueron utilizados como aditivos de la gasolina, pero han sido eliminados en la mayoría de los países desarrollados.

El plomo en el organismo humano se encuentra primeramente en la sangre, el exceso entra en los tejidos blandos, en los órganos, principalmente en el cerebro, y también puede depositarse en los huesos, reemplazando al calcio. La absorción de plomo aumenta en personas con deficiencia de calcio o hierro y es mayor en niños que en adultos. El plomo permanece en el cuerpo humano durante años, por lo que puede acumularse en el organismo, sin embargo no se biomagnifica.

La intoxicación aguda por plomo en humanos puede causar mal funcionamiento de los riñones, del sistema reproductivo, del hígado, del cerebro, del sistema nervioso; mientras que el envenenamiento leve por plomo causa anemia. Las víctimas podrían presentar dolores de cabeza, dolores musculares, fatiga e irritabilidad. Sin embargo el plomo no representa un problema importante en el agua de consumo (excepto en casos aislados) aunque puede existir riesgo si se utilizan tuberías de plomo [1].

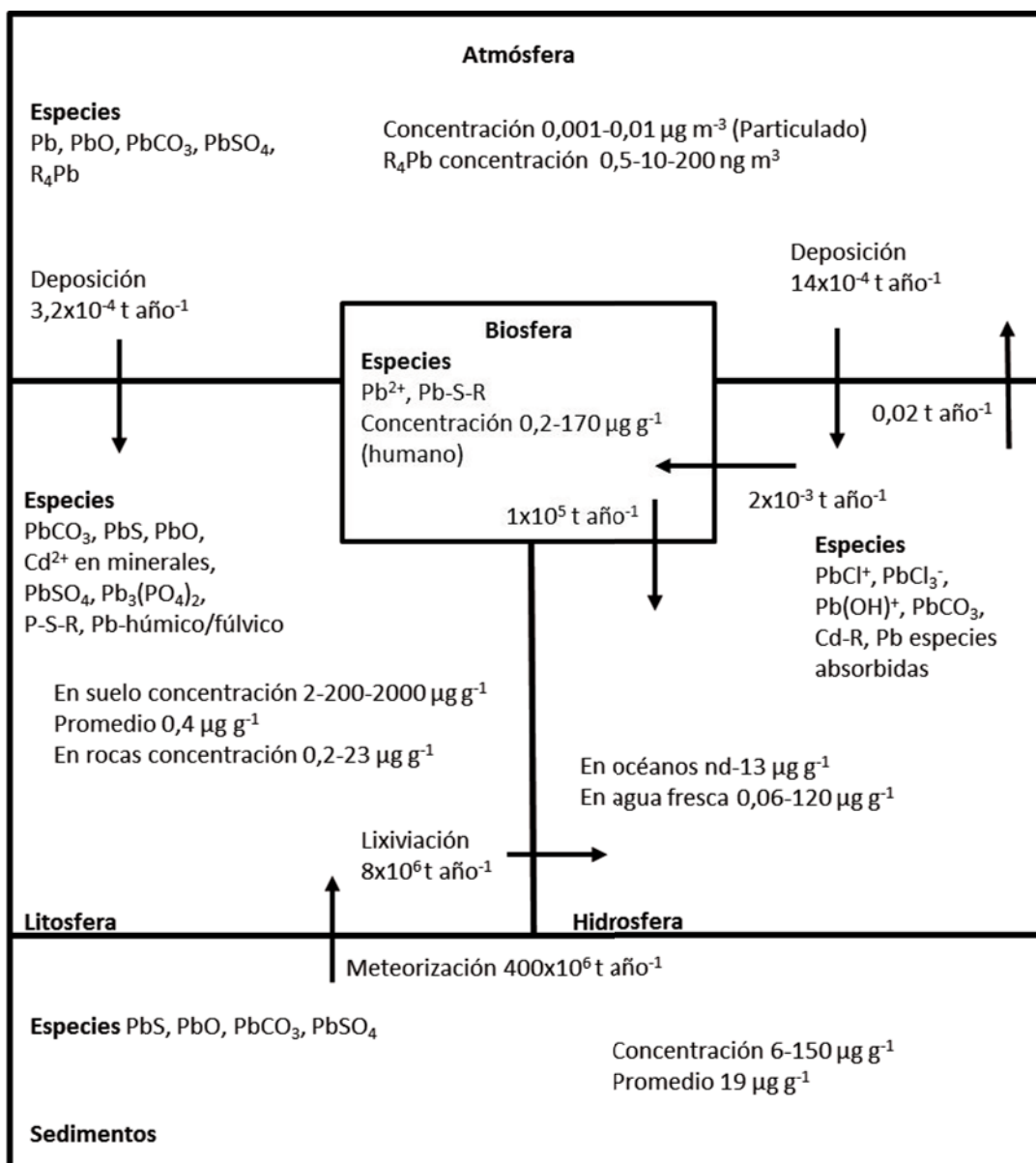


Figura 2. Ciclo biogeoquímico del plomo. Contribuciones externas hacia la atmósfera: quema de carbón y de petróleo, pinturas externas, fundición de plomo, fundición no ferrosa. Hacia la litosfera e hidrosfera: depósito de aerosol. Adaptado de [6].

1.3. Cobre

El cobre es un elemento traza esencial para el organismo humano, que debe ser ingerido a través de la dieta ya que no es sintetizado por el propio cuerpo. Una deficiencia leve de cobre disminuye la eficacia de los glóbulos blancos para combatir las infecciones. Igualmente es necesario para la absorción adecuada de hierro por el organismo, ya que una insuficiencia de cobre puede conducir a una disminución de la producción de hemoglobina dando como resultado anemia. El cobre también interviene en varias reacciones enzimáticas, como catalizador de reacciones de proteínas, para transportar oxígeno y en el metabolismo de los ácidos grasos [8,9].

El cobre puede estar presente en la superficie terrestre como metal nativo libre, o en los estados de oxidación +1 o +2. En disolución también puede estar presente como Cu(II) o Cu(I), aunque predomina el Cu(II) debido a las reacciones redox que tienen lugar en aguas en contacto con el aire y a la tendencia del Cu(I) a oxidarse. Los iones cobre son propensos a complejarse especialmente con el ion hidroxilo y los carbonatos [10].

Las fuentes de contaminación por cobre más usuales del medio ambiente son: el chapado de metal, la minería y los desechos industriales [1].

Como cualquier mineral traza esencial, un exceso de cobre en el organismo puede ser tóxico, pudiendo causar dolor de estómago, diarrea, eczema, anemia hemolítica, alta presión sanguínea, enfermedades del riñón y severos daños en el sistema nervioso central [11]. El exceso de Cu se acumula en el hígado, lo que conduce al desarrollo de cirrosis, pudiendo causar que se deposite en otros tejidos extrahepáticos, incluyendo el cerebro y la córnea [12]. La acumulación de cobre también podría producirse por enfermedades que causen deterioro en la excreción biliar aún sin un consumo excesivo de dicho metal [9]. Sin embargo no hay evidencias de su biomagnificación en la cadena trófica. En la Figura 3 se muestra el ciclo global del cobre.

1.4. Mercurio

Los efectos del mercurio sobre la salud humana dependen de su forma bioquímica y de la naturaleza de su exposición.

El mercurio existe en tres estados de oxidación $\text{Hg}(0)$, $\text{Hg}(\text{I})$ y $\text{Hg}(\text{II})$. El vapor de mercurio y en menor grado las sales de mercurio $\text{Hg}(\text{II})$ atacan el sistema nervioso central, pero los principales objetivos del $\text{Hg}(\text{II})$ son el riñón y el hígado.

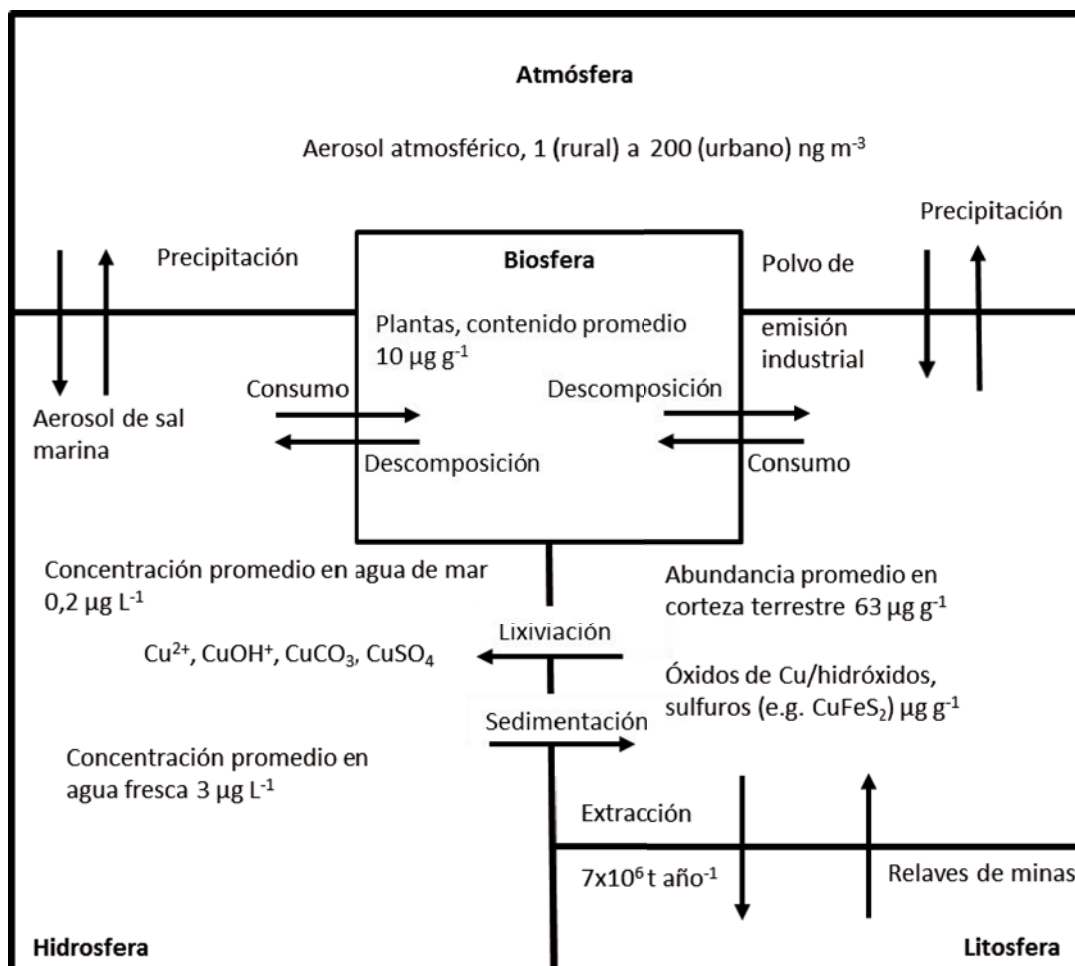


Figura 3. Ciclo global del cobre, principales características. Adaptado de [13].

En los derivados organometálicos de $\text{Hg}(\text{II})$, éste está covalentemente unido a uno o dos átomos de carbono, siendo la parte orgánica generalmente un grupo alquilo o un grupo alcoxialquilo. Los compuestos formados son más tóxicos, debido a que son absorbidos más fácilmente y posteriormente metabolizados. Así, puede unirse a un grupo metilo, formando dimetilmercurio $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$. Este compuesto se forma en los sedimentos fangosos de los ríos y lagos, y en ausencia de oxígeno se volatiliza rápidamente del agua, pero en medio ácido puede transformarse en metilmercurio. El metilmercurio a menudo representado por CH_3Hg^+ (fragmento molecular proveniente de compuestos como CH_3HgCl y CH_3HgOH en forma general representados por CH_3HgX), se forma

más fácilmente que el $\text{Hg}(\text{CH}_3)_2$ y, su formación predomina sobre éste en disoluciones ácidas o neutras ya que es soluble en los tejidos grasos de animales y se bioacumula y biomagnifica. El metilmercurio es la forma más tóxica del mercurio seguida por el vapor de mercurio. Una vez ingerido el CH_3HgX se transforma en un compuesto en el que X puede ser un aminoácido que contiene azufre, siendo soluble en tejidos biológicos en algunas de estas formas. En cambio el $\text{Hg}(\text{II})$ no se transporta fácilmente a través de las membranas biológicas y el Hg_2^{2+} no es muy tóxico debido a que en el estómago se combina con los Cl^- para formar Hg_2Cl_2 , el cual es insoluble [4,7].

Las fuentes de contaminación por mercurio pueden ser de origen natural, volcanes o yacimientos, antropogénicas derivadas de procesos industriales, como el proceso clor-álcali, la quema no regulada de carbón y de fueloil, la incineración de residuos que contienen mercurio y la minería.

La mayor parte de mercurio en el aire se encuentra en forma de $\text{Hg}(\text{II})$, el cual está unido a las partículas suspendidas que finalmente se depositan en los sedimentos [4].

Debido a los riesgos que implican las formas tóxicas del mercurio, la unión europea ha elaborado el reglamento “relativo a la prohibición de la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio y al almacenamiento seguro de mercurio metálico” presentado en el 2008 [14], que como su nombre indica prohíbe la exportación del mercurio y sus mezclas por parte de la Unión Europea, para reducir de forma importante la oferta mundial de mercurio y, por consiguiente, garantizar su almacenamiento seguro.

2. Interés de la determinación de metales pesados

La presencia de metales pesados en los suelos supone un riesgo ya que por lixiviación pueden pasar hacia aguas superficiales y subterráneas, y también pueden ser absorbidos por las plantas como etapa previa al paso a la cadena trófica.

Tal como se ha explicado anteriormente, cuando los niveles de contaminación por metales que se alcanzan en las diferentes esferas del medio ambiente son muy altos, tanto los elementos esenciales (Cu, Zn, Mn, Fe, Ni, Mo), como los no esenciales (Cd, Pb, Hg) pueden llegar a ser un problema. Es por esta razón que el establecimiento de metodologías analíticas para la determinación de estos elementos en el medio ambiente es muy importante, no sólo para conocer el nivel de contaminación que hay sino también para establecer el nivel basal.

En la bibliografía se puede encontrar un número elevado de publicaciones relativas a la determinación de metales pesados en diferentes muestras, en estas publicaciones se puede ver que hay una gran variedad de técnicas y de métodos analíticos que permiten su determinación. Evidentemente en la selección de la técnica, se deben tener en cuenta factores como el nivel de concentración en que se encuentra el analito, la precisión requerida, la cantidad de muestra disponible o el objetivo del análisis. Las técnicas analíticas que se pueden utilizar para la determinación de metales a niveles de concentración bajos varían en complejidad, pudiéndose considerar un conjunto de técnicas sencillas como son algunas técnicas espectroscópicas o las electroanalíticas, otras más complejas como serían la espectrometría de emisión atómica con plasma acoplado inductivamente (ICP-AES) o la espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente (ICP-MS), para acabar con algunos acoplamientos de cromatografía líquida de alta resolución con espectrometría de absorción atómica con atomización electrotérmica (ETAAS-HPLC) o con espectrometría de masas con plasma acoplado inductivamente y cromatografía de alta resolución (HPLC-ICP-MS) entre otras. A todas estas técnicas instrumentales se pueden adaptar diferentes procedimientos de preconcentración y *clean-up* para mejorar la señal analítica [15].

De entre las técnicas electroanalíticas, las voltamperométricas constituyen un grupo de técnicas que se han aplicado ya desde sus inicios a la determinación de iones metálicos a niveles bajos de concentración. Estas técnicas a pesar de su complejidad conceptual, en comparación con otras técnicas instrumentales utilizadas en química analítica,

presentan una elevada sensibilidad y selectividad, una gran capacidad para diferenciar entre diferentes especies químicas de un mismo elemento, una simplicidad instrumental y un bajo coste. Estas ventajas las hacen especialmente interesantes para el análisis tanto de especies orgánicas como inorgánicas en diferentes tipos de muestras a niveles muy bajos de concentración.

La Figura 4 ilustra las posibilidades de las técnicas voltamperométricas frente a otras técnicas analíticas y las relaciona con posibles aplicaciones.

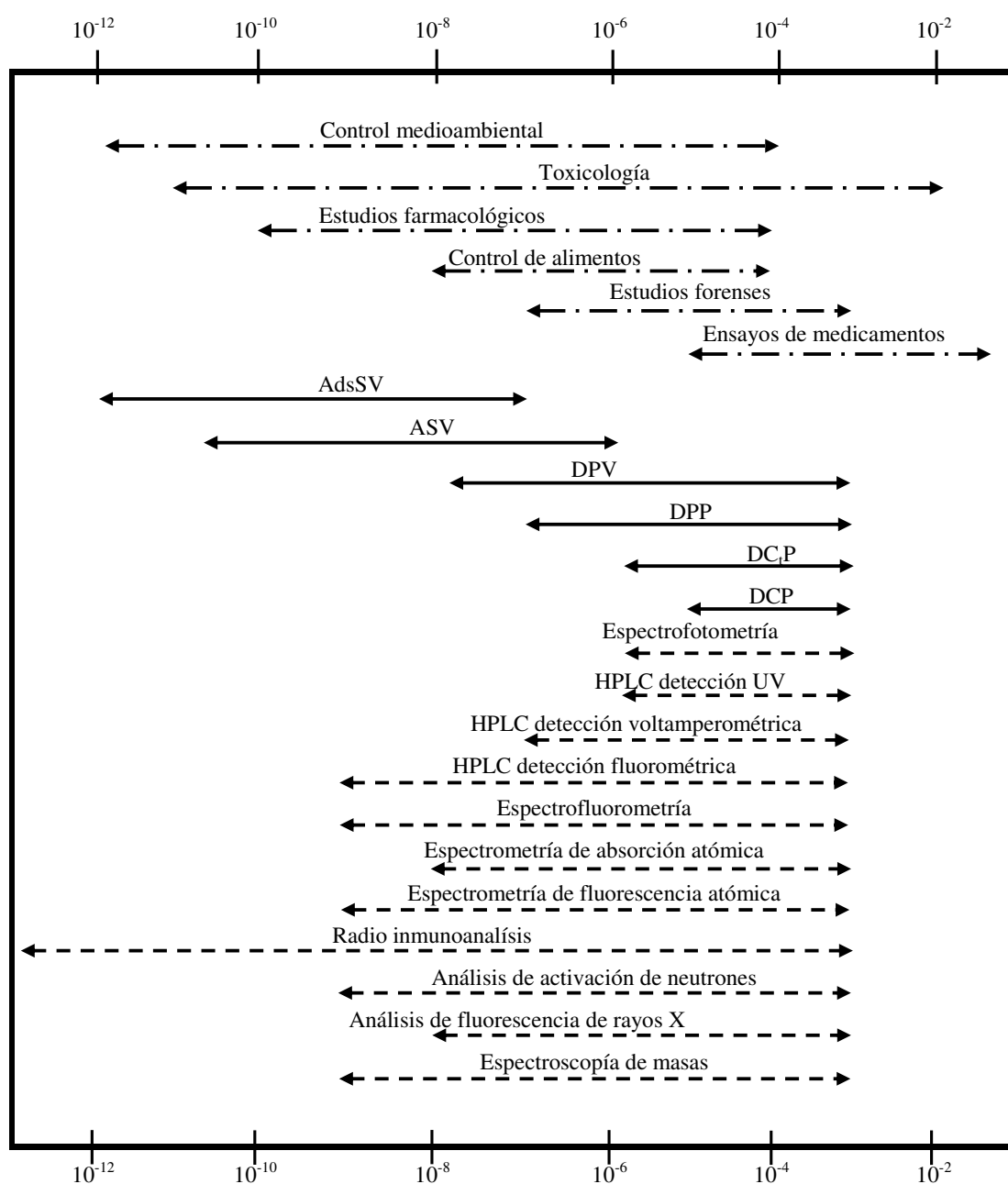


Figura 4. Intervalos de aplicación de las diferentes técnicas analíticas. Adaptado de [16].

En los medios naturales los iones metálicos interaccionan con un gran número de especies químicas (ligandos) para formar complejos, es por esto que el interés de la Química Analítica no es sólo la determinación analítica de iones metálicos sino que también el estudio de los procesos de complejación en los que intervienen. En particular, la utilización de las técnicas voltamperométricas para el estudio de procesos de complejación es muy adecuada debido a la capacidad que tienen en diferenciar entre la especie libre y la complejada y en el seguimiento de las cinéticas de los procesos de complejación [17–19]. Es por esta razón que en la presente tesis doctoral se pretende verificar la viabilidad de la utilización de dispositivos serigrafiados en estudios de complejación.

La manera de llevar a cabo este tipo de estudios de complejación, es a través de la realización de valoraciones de un ligando sintético con un metal o viceversa. En algunos casos, las medidas obtenidas requieren de un tratamiento posterior por métodos quimiométricos como el de resolución de curvas multivariantes con mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS), para obtener información sobre la estequiometría de los complejos del metal-ligando del sistema.

Los sistemas complejantes considerados en uno de los trabajos de esta tesis han sido el del Cd(II) con el glutatión (GSH) y el Cd(II) con las fitoquelatinas (PCs). El GSH y las PCs son ligandos de gran interés biológico y medioambiental ya que, como se ha dicho anteriormente, participan en la complejación de los metales que pueden llegar a las células de las plantas, algas u hongos como consecuencia de un proceso de contaminación. Estas moléculas se sintetizan en el interior de las células de las plantas y complejan al ion metálico, el complejo formado se almacena en las vacuolas y su toxicidad disminuye.

El interés del estudio de las interacciones de los iones metálicos con las PCs y el GSH está relacionado con la contaminación de suelos por metales pesados y en su persistencia en los mismos. Este hecho hace que aumente el interés en el estudio del establecimiento de metodologías que permitan remediar suelos contaminados. Para esta remediación se pueden aprovechar las habilidades naturales de las plantas para captar los metales para posteriormente fijarlos complejándolos con las PCs. Este proceso se conoce como fitorremediación que es una tecnología, innovadora, costo-efectiva y ambientalmente saludable que consiste en el uso de plantas (verdes o basculares) para restaurar o estabilizar terrenos y aguas contaminadas.

3. Técnicas voltamperométricas para la determinación de metales pesados

Las técnicas voltamperométricas engloban un conjunto de técnicas en las que se interpretan las curvas de intensidad-potencial obtenidas al aplicar una función de potencial a una celda electroquímica que contiene la disolución de medida. El sistema electródico está formado por un electrodo de trabajo, uno de referencia y uno auxiliar. La señal de excitación (una función del potencial) se aplica entre el electrodo de trabajo y el electrodo de referencia, y la intensidad se mide entre el electrodo de trabajo y el auxiliar [20].

El funcionamiento de la voltamperometría está fuertemente influenciado por los materiales de los electrodos de trabajo utilizados. El electrodo de trabajo ideal debe proporcionar medidas con una señal-ruido favorable, así como respuestas reproducibles. Para la selección del material del electrodo de trabajo no sólo se debe considerar el comportamiento redox de los analitos de interés sino también el intervalo de potencial de trabajo del material seleccionado, además del ruido de fondo en la región de potencial requerido para las medidas. Otras consideraciones incluyen la conductividad eléctrica, la reproducibilidad de la superficie, las propiedades mecánicas del electrodo, coste y disponibilidad. Una amplia gama de materiales han sido utilizados para la fabricación de electrodos de trabajo, pero los más populares son el mercurio, el carbono o los metales nobles como el platino y el oro [21].

El electrodo de gotas de mercurio fue descubierto por Lippmann en 1973, desarrollado por Kucera a principios del siglo XX (1903) [22] y posteriormente utilizado por Heyrovský en 1920 en su técnica polarográfica [23]. Este electrodo consistía en un tubo capilar de vidrio unido, mediante un tubo flexible de plástico, a un depósito de mercurio dispuesto a una altura determinada y fijado mediante un soporte [23]. El mercurio fluía gota a gota por el capilar a una velocidad que dependía de la altura del depósito y del diámetro del capilar.

Desde la invención de la polarografía por el checoslovaco Jaroslav Heyrovský en 1920, el mercurio se estableció como el material electródico indiscutible en electroquímica para trabajar en la zona de potencial catódico. Durante muchos años el mercurio se ha mantenido como el material electródico por excelencia en las medidas polarográficas y voltamperométricas que se utilizan para la determinación de compuestos orgánicos e

inorgánicos que se oxidan o reducen en la zona negativa de la escala de potencial, debido a su amplio rango catódico, a su alta sensibilidad y reproducibilidad, a su capacidad de renovación y a su superficie que permite tener un electrodo nuevo a cada medida de potencial [21].

La gran desventaja del electrodo de mercurio es su rango anódico limitado que es consecuencia de su propia oxidación, la cual tiene lugar a potenciales de +0,05 V en condiciones muy favorables.

Entre los principales diseños de los electrodos de mercurio utilizados en voltamperometría se encuentran: *i)* el electrodo de gotas de mercurio (DME, *dropping mercury electrode*); *ii)* el electrodo de gota estática de mercurio (SMDE, *static mercury drop electrode*); *iii)* el electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE, *hanging mercury drop electrode*); y *iv)* el electrodo de película de mercurio (MFE, *mercury film electrode*). Todas estas modalidades de electrodos de mercurio han sido utilizadas exitosamente en incontables aplicaciones que implican la reducción u oxidación de compuestos electroactivos orgánicos e inorgánicos, cuando el proceso tiene lugar en la zona catódica de potencial [24,25].

El electrodo de gotas de mercurio clásico fue utilizado en estudios de electrocapilaridad y en las primeras aplicaciones polarográficas. El desarrollo de este electrodo ha llevado a los actuales DME y SMDE. Aunque el más utilizado es el SMDE ya que los límites de detección obtenidos con el DME están afectados por una elevada corriente de fondo, debido al constante cambio de área del electrodo a lo largo de la medida [21,25]. En el SMDE, la formación y crecimiento de la gota tiene lugar muy rápidamente y se mantiene sin cambio hasta el final de su vida (cuando se genera una nueva gota) [23]. Tanto el DME como el SMDE se utilizan en polarografía de corriente continua (DCP), en polarografía de impulsos normal (NPP), en polarografía de impulsos diferencial (DPP) y en polarografía de corriente alterna (ACP) [25].

Con el HMDE, a diferencia de los anteriores electrodos, se mantiene una misma gota a lo largo de todo el barrido de potencial. Este electrodo se utiliza tanto en las técnicas voltamperométricas de redisolución (SV, *stripping voltammetry*) como en la voltamperometría lineal (LSV, *linear sweep voltammetry*) o la voltamperometría cíclica (CV, *cyclic voltammetry*). La utilización del HMDE junto con las diferentes variantes de técnicas de redisolución supuso un gran avance en las técnicas voltamperométricas que

permitió la determinación de analitos a unos niveles de concentración muy bajos [25]. En la Figura 5 se muestra la variación del crecimiento de la gota de mercurio, respecto al tiempo para los electrodos DME, SDME y HMDE.

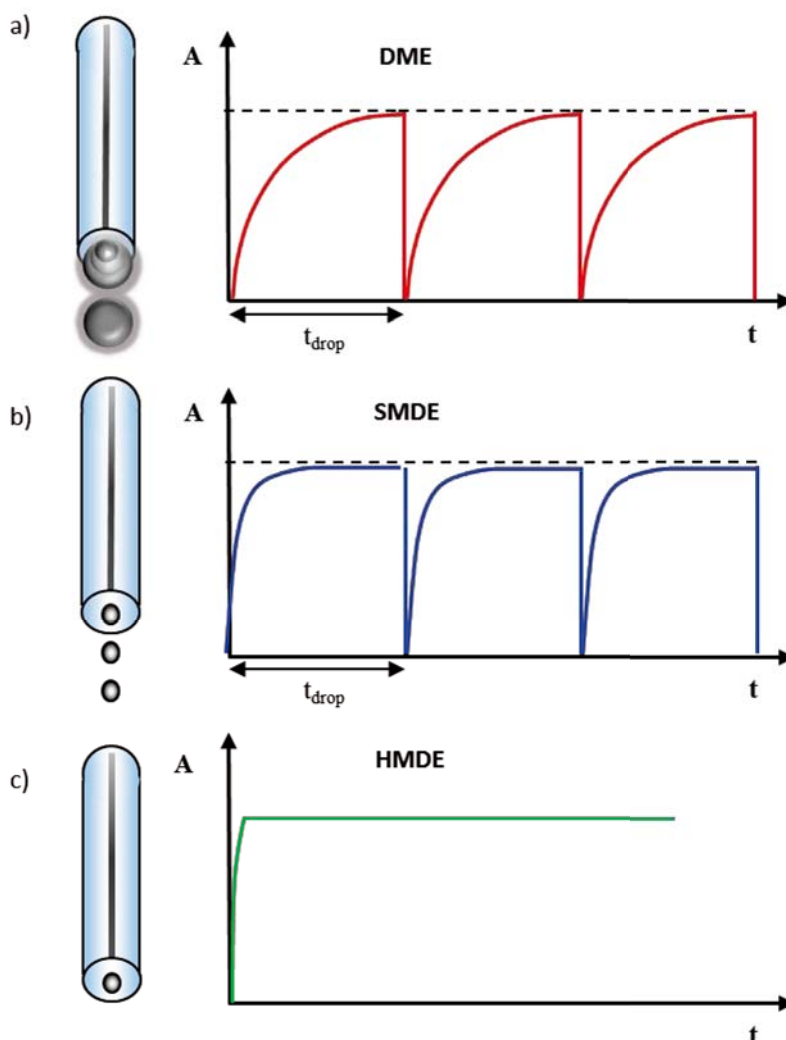


Figura 5. Crecimiento de la gota de mercurio (A , área de la gota) respecto al tiempo a) DME, b) SDME, y c) HMDE. t_{drop} = tiempo de vida de la gota.

Finalmente los electrodos de película de mercurio (MFE) se preparan mediante el recubrimiento de un sustrato adecuado con una fina película de mercurio metálico. Normalmente el recubrimiento se lleva a cabo por reducción del mercurio $Hg(II)$ de una disolución a Hg^0 en la superficie de un electrodo de carbono vitrificado [23]. Esta película también se puede preparar depositando directamente Hg metálico sobre un electrodo de oro. El inconveniente de los MFE es la renovación de la superficie del

sustrato y la regeneración de la película. En los MFE se pueden aplicar las mismas variantes voltamperométricas que con un HMDE.

A pesar de las grandes ventajas que presenta la utilización de los electrodos de mercurio en medidas voltamperométricas en donde cabe resaltar la posibilidad de medir niveles de concentración muy bajos, la capacidad de detectar más de un analito simultáneamente, así como la capacidad en algunos casos, de diferenciar entre distintas especies de un mismo elemento, además de su robustez, reproducibilidad y de la fácil renovación de su superficie en la mayoría de los casos, en los últimos años se han visto envueltos en una fuerte polémica debido a la potencial toxicidad del mercurio.

Como ya se ha comentado anteriormente el mercurio metálico a temperatura ambiente es inocuo, si bien es cierto que sus vapores y sales son tóxicos. Motivo por el cual la Unión Europea regula el empleo y ámbito de aplicación del mercurio para reducir de forma drástica sus emisiones, prohibiéndose por lo tanto cualquier exportación de mercurio metálico y de ciertos compuestos o mezclas de mercurio. Los estados miembros deben garantizar el almacenamiento seguro de este metal, cuando se utilice o produzca en el ámbito de determinadas actividades industriales [14,26]. No obstante el SOCOPSE (Source of priority substances in Europe) asegura que esta legislación no afecta al trabajo en el laboratorio en un futuro próximo [27]. Si se toman las precauciones adecuadas la utilización del mercurio como material electródico no debería suponer ningún problema.

3.1. Electrodos de trabajo basados en materiales diferentes del mercurio

Si bien no hay una prohibición clara en el uso de mercurio como material electródico, aproximadamente a partir del año 2000 se han hecho considerables esfuerzos para desarrollar electrodos basados en nuevos materiales que puedan reemplazar a los electrodos de mercurio. Así pues, uno de los retos es el desarrollo de dispositivos fiables que puedan ser usados con las técnicas voltamperométricas para el análisis tanto de especies metálicas como especies orgánicas a niveles de concentración bajos que puedan sustituir a los electrodos de mercurio.

Entre algunos materiales más tradicionales alternativos al mercurio se podrían citar el carbono, oro, plata o iridio, pero aunque ofrecen señales útiles para varios metales, su

funcionamiento general no se acerca al de los electrodos de mercurio, debido a su restringido intervalo de potencial en la zona catódica, a que los picos aparecen muy distorsionados y con un ruido excesivo y a la baja precisión y resolución de las medidas [28–30].

Sin embargo, se vio que el bismuto podía suponer una buena opción como material electródico sustitutivo del mercurio.

El bismuto fue introducido por primera vez con muy buenos resultados en el año 2000 por Wang *et al.* [31] como material electródico en un electrodo de película de bismuto (BiFE), el cual está formado por una película fina de bismuto sobre un sustrato de carbono. La menor toxicidad del bismuto, en comparación con la del mercurio y, sobre todo, los prometedores resultados que se obtuvieron, hicieron que los electrodos basados en este material fueran atractivos para aplicaciones de rutina.

Los BiFE, han demostrado ser muy adecuados para ser utilizados en técnicas como la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) y la voltamperometría de redisolución con etapa previa de adsorción (AdSV). Su límite anódico es un poco más negativo que el mercurio, ya que el bismuto se oxida más fácilmente que éste, mientras que el límite catódico de los BiFEs (cerca de -1,25 V vs. Ag/AgCl a pH 4,5) viene determinado por la reducción del hidrógeno y no difiere significativamente del límite catódico de los electrodos de mercurio, bajo las mismas condiciones. Aun así, el rango de potencial accesible de los BiFEs es menor que el de los de mercurio [32], por lo cual la búsqueda de materiales alternativos al mercurio continúa siendo un reto en la actualidad.

Otra opción atractiva que puede superar algunas de las limitaciones del bismuto es el antimonio. Los primeros trabajos con este material fueron realizados por Hocevar *et al.* en el año 2007 [33] pero hay que indicar que a día de hoy el número de publicaciones es todavía muy escaso [33].

Debido a las posibilidades que ofrecen el bismuto y el antimonio como materiales electródicos, en esta tesis doctoral se han considerado estos materiales para la modificación de electrodos serigrafiados. Los electrodos convencionales modificados con estos materiales son los de película en donde el sustrato es un disco de carbono vitrificado sobre el que se deposita de forma *ex-situ* o *in-situ* una fina película de Bi o Sb (BiFE o SbFE, respectivamente). La aparición en el mercado de los electrodos serigrafiados (SPE, *screen-printed electrode*) ha abierto un campo de aplicación

amplísimo para la utilización de estos dispositivos en medidas voltamperométricas, ya que se pueden modificar fácilmente y permiten tener dispositivos desechables para medidas *in-situ*.

A continuación se describirá la situación en que están las investigaciones con electrodos de bismuto y de antimonio.

A pesar que los electrodos de bismuto se conocen desde 1930 y han sido utilizados en aplicaciones potenciométricas [34]. No fue hasta el año 2000, en que Wang *et al.* reportaron, como ya se ha dicho anteriormente, por primera vez el uso de un electrodo de carbono cubierto con una película de bismuto preparada *in-situ* para la determinación de Cd(II), Pb(II) Th(I) y Zn(II) por ASV [31], como una alternativa al MFEs y en general para los electrodos basados en mercurio. Posteriormente, Wang *et al.* [35] realizaron otra contribución preparando la película por electrodeposición *ex-situ*. Desde los primeros trabajos se ha experimentado un progreso muy importante en las investigaciones relacionadas con estos dispositivos, reportándose trabajos con una amplia variedad de diseños, ofreciendo la mayoría una amplia aplicabilidad en la resolución de importantes problemas analíticos [36]. De manera general las aplicaciones de los BiFEs se han llevado a cabo mediante medidas por voltamperometría de redisolución.

Las principales ventajas de los electrodos de bismuto son: su baja toxicidad, propiedades electroquímicas parecidas a las del mercurio, proporcionan señales bien definidas con una buena resolución entre picos y con ruido de fondo comparable a las obtenidas con el mercurio, y su amplio intervalo de linealidad.

La capacidad de los electrodos de bismuto para la determinación de metales pesados está asociada a su capacidad para formar aleaciones de multicomponentes, lo cual facilita el proceso de nucleación durante la deposición del metal [37].

El bismuto normalmente puede ser electrodepositado en los mismos tipos de sustratos utilizados en la formación de películas de mercurio. Entre los sustratos descritos se encuentran diferentes formas de carbono, como por ejemplo carbono vitrificado, pasta de carbono, ceras impregnadas con grafito o las tintas de carbono para serigrafiado. Entre los sustratos de carbono más utilizados en la fabricación de BiFEs el carbono vitrificado es el que genera una baja corriente de fondo, pero es un material más caro.

En cambio los electrodos de pasta de carbono son más fáciles de fabricar y de activar y además resultan más baratos, aunque presentan importantes problemas de lixiviación.

La formación de la película de bismuto es un paso crítico para el funcionamiento satisfactorio del dispositivo.

Hay tres métodos generales para el recubrimiento de la superficie del sustrato con bismuto: *i)* electrodeposición *ex-situ*: el electrodo se sumerge en una disolución de Bi(III) y después de la aplicación de un potencial apropiado, los iones Bi^{3+} son reducidos a Bi metálico y electrodepositados en la superficie del electrodo; después el electrodo modificado con la película de bismuto se coloca en la disolución de análisis; *ii)* electrodeposición *in-situ*: los iones Bi^{3+} se añaden directamente a la disolución de análisis y se depositan electroquímicamente en la superficie del electrodo durante el análisis; *iii)* modificación a partir de un precursor de bismuto: la modificación con Bi tiene lugar durante la fabricación del electrodo y se basa en la preparación de una mezcla entre la pasta de carbono y una determinada cantidad de precursor de bismuto antes de la fabricación del electrodo; después, el bismuto precursor es electroquímicamente reducido a Bi metálico a un potencial seleccionado. Un método alternativo para la fabricación de electrodos de bismuto se basa en las técnicas de *sputtering* [32,36,37]. En un apartado posterior se explicará con detalle los diferentes métodos de formación de las películas.

Entre las ventajas que ofrece el BiFE en análisis por voltamperometría de redisolución es que una misma película se puede utilizar para una serie de medidas. Para su posterior utilización el electrodo se debe reactivar por polarización a un potencial que facilite la oxidación o reducción de cualquier especie remanente. En ASV, este paso implica una limpieza a un potencial más negativo que el potencial de oxidación del bismuto y más positivo que el potencial de oxidación del ion metálico; igualmente el potencial exacto de aplicación para la limpieza depende del análisis que se esté llevando a cabo [32].

Otro electrodo de bismuto a considerar es el electrodo de bismuto puro, el cual consiste en un disco de bismuto metálico puro policristalino montado en el interior de un tubo aislante y en contacto con un material conductor. Aunque no es una película estrictamente, sus propiedades y su superficie activa son similares a la del BiFE. La ventaja de este electrodo es que no es necesario el paso de electrodeposición del bismuto sobre la superficie del electrodo y que su superficie puede ser fácilmente regenerada mediante pulido [40,41].

Los elementos que pueden ser determinados con los electrodos de bismuto deben tener un potencial estándar más negativo que el bismuto como ya se explicó, por lo cual los iones metálicos que normalmente se determinan mediante ASV con estos electrodos son Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Tl^+ , e In^{2+} . Sin embargo, en algunos casos, como es cuando el electrodo de bismuto se prepara *in-situ*, ha sido posible la determinación de Cu(II) , el cual tiene un potencial estándar menos negativo que el del Bi [31,37,42]. Con un electrodo de bismuto preparado *ex-situ* dicha determinación no ha sido posible ya que con esta modalidad de película únicamente se pueden determinar metales con un potencial estándar más negativo que el Bi, debido a que la película de bismuto se destruiría a estos potenciales. Otros metales como el Ni(II) , Co(II) y Cr(III) se han podido determinar por AdSV [43,44]. En la mayoría de casos la metodología de detección es similar a la utilizada con los MFE.

Entre las aplicaciones más relevantes están la determinación de Cd y Pb en matrices tan diversas como cabello [45], agua embotellada, y agua de consumo [35,46,47], suelos [48], fluidos biológicos [46] y productos alimenticios [47].

El Ni(II) y el Co(II) han sido cuantificados en suelos [43], minerales de hierro, agua de río, etc. utilizando como complejante la dimetilglioxima [44]. El Cr(III) ha sido determinado por AdSV en agua embotellada, suelos y tabaco después de complejarse con cupferron [44].

Los principales problemas que presentan estos electrodos resultan de la contaminación de su superficie y a que son menos reproducibles que los electrodos de mercurio; además hay un número elevado de compuestos que son activos en su superficie. Este problema se podría solucionar asegurando la cobertura de la película de bismuto con alguna membrana como por ejemplo el nafion que además proporciona resistencia mecánica al electrodo [49].

Un problema que se ha observado con los BiFEs, es la formación de compuestos intermetálicos. Se ha visto que la formación, por ejemplo, de un compuesto intermetálico de Cu-Zn interfiere en el análisis de Zn(II) cuando se tiene un exceso de Cu. Esta interferencia se puede superar con la adición de iones Ga^{2+} [20,37].

En medidas voltamperométricas en la zona de potencial catódico con electrodos de mercurio, la presencia de oxígeno disuelto puede causar distorsión de las señales analíticas, por lo cual es necesario desoxigenar la disolución, purgando con nitrógeno o

helio. En cambio, se ha visto que los electrodos de bismuto son menos sensibles a la presencia del oxígeno lo que hace innecesaria la etapa de desoxigenación; este hecho supone una ventaja en este tipo de dispositivos [43,50].

Otra limitación del electrodo de bismuto se encuentra de nuevo en la determinación de Cu(II) que es consecuencia de la competencia entre Cu(II) y el Bi(III) por electrodeponerse en la superficie del electrodo [42]. Debido a esta competencia, la presencia de Cu(II) puede interferir en la determinación de Pb(II) y Cd(II) debido a que disminuye la sensibilidad de la película de bismuto. Esta fue una de las razones por las que se pensó en la utilización de antimonio como material electródico para la determinación de algunos iones metálicos [51].

El uso del antimonio como material electródico para medidas de pH potenciométricas ya fue reportado por primera vez en 1923 por Uhl y Kestranek [52], y fue seguido por otras contribuciones relevantes. En estos dispositivos para la medida de pH se utiliza el antimonio/óxido de antimonio como material electródico, el cual ha sido utilizado también como un electrodo selectivo de iones metálicos en medidas en laboratorios y aplicaciones biomédicas [54–56].

No fue hasta en el año 2007, cuando Hocevar *et al.* [33] propusieron el electrodo de película de antimonio (SbFE, *antimony film electrode*) como dispositivo para la determinación de iones metálicos mediante técnicas voltamperométricas. En este trabajo, se presenta la caracterización de éste electrodo y su aplicación en la determinación de Pb(II) y Cd(II) mediante ASV y cronopotenciometría de redisolución (SCP). Como resultado más relevante se vio que después de cada medida era necesario acondicionar la superficie del electrodo para eliminar trazas de los analitos adsorbidos en ella. Para ello, se debe aplicar un potencial positivo (+0,3 V) durante 30 s siendo este pretratamiento fundamental para la utilización de estos dispositivos.

Los métodos de preparación de las películas de antimonio son los mismos que los descritos para los electrodos de bismuto siendo los sustratos más utilizados para la formación de la película el carbono vitrificado y la pasta de carbono. No obstante, se han utilizado otros sustratos como el oro y el platino, y en menos ocasiones el diamante dopado de boro [56]. A pesar de la variedad de posibles sustratos, se obtienen mejores resultados con carbono que con oro o platino [57].

Posteriormente al primer estudio de determinación de metales con un SbFE, se han continuado realizando estudios de la determinación de metales vía *in-situ* como Zn(II), Cd(II), Pb(II), Tl(I), In(III), Cu(II) y Hg(II) mediante técnicas de redisolución. Se ha aplicado a la determinación simultánea de Cd(II) y Pb(II) utilizando diferentes sustratos basados en carbono por voltamperometría de onda cuadrada con redisolución anódica (SWASV, *square wave anodic stripping voltammetry*) en muestras de agua de río [33,58], por cronopotenciometría de redisolución (SCP, *stripping chronopotentiometry*) [59], con cobertura de nafion por voltamperometría de redisolución con impulsos diferencial (DPASV) en zanahorias y en agua de río [60]. Se ha reportado también un estudio de la determinación de Hg(II) en presencia de Cu(II) por ASV en muestras de agua [61].

Respecto a la determinación de Cu(II), en un estudio en que se quería llevar a cabo la determinación simultánea de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) por ASV con un microelectrodo de película de antimonio (SbFME), aunque no se logró determinar simultáneamente estos metales, este estudio demostró las posibilidades de este electrodo para la determinación de Cu(II) [62]. Posteriormente, dos estudios independientes demostraron la determinación individual de Cu(II) por SWASV [63,64]. En uno de estos estudios también se considera la determinación simultánea de Zn(II) y Tl(I), y la de In(III) [64]. También se ha descrito la determinación de Zn(II) en presencia de Cd(II) y Pb(II), en la que se utilizaron diferentes sustratos de carbono y de metales Au y Pt [57]. Además se ha reportado la determinación de Ni por AdSV [65].

Igualmente se ha descrito en la bibliografía la utilización de un electrodo de diamante dopado de boro, modificado con nanopartículas de antimonio para la determinación de Cd(II) y Pb(II) por voltamperometría de barrido lineal con redisolución anódica (LSASV, *linear sweep anodic stripping voltammetry*) [56]

Hasta la fecha son pocos los estudios dedicados a la determinación de metales pesados con SbFE preparados vía *ex-situ*. Entre estos cabe resaltar la determinación de Cd(II) y Pb(II) por ASV y de Ni(II) por AdSV [66]. Entre otros trabajos se reporta la caracterización de un SbFE vía *ex-situ*, preparado sobre un electrodo de carbono vitrificado, en el que se optimizan parámetros electroanalíticos para la formación de la película de antimonio como el pH de la disolución utilizada para la electrodeposición, el tiempo de deposición de la película de antimonio, o el potencial de deposición de la

película de antimonio, el efecto de la concentración de antimonio en la película, y se determina el espesor de película [67].

También se reporta la preparación de un electrodo de Sb utilizando como sustrato pasta de carbono y antimonio, con el que se determina Cd(II) y Pb(II) por ASV [68].

3.2. Preparación de las películas

Tal como se ha dicho anteriormente, los métodos generales de preparación de películas de bismuto o antimonio en dispositivos electroquímicos son los siguientes:

- i) Método *ex-situ*
- ii) Método *in-situ*
- iii) Modificación a partir de un precursor
- iv) Método *sputtering*

En ciertos casos se requiere una etapa previa de acondicionamiento de la superficie electroquímica antes de la preparación de la película vía *ex-situ* o *in-situ* con el objetivo de eliminar las sustancias que pueden estar adsorbidas en ella. Esta etapa implica el pulido de la superficie con diferentes sustancias abrasivas y su posterior limpieza con agua y etanol.

Método *in-situ*

El método de deposición *in-situ* consiste en adicionar el Bi(III) [31] o el Sb(III) [33] directamente en la disolución de medida y el metal se deposita en forma de película en la superficie del electrodo durante el análisis junto con los analitos cuando la medida se lleva a cabo por ASV. Una consideración importante de este método es que la concentración de metal que ha de constituir la película debe ser al menos diez veces superior a la concentración del analito a determinar, para evitar efectos de saturación [31,42,45,69]. Con este método se simplifica y acorta el procedimiento experimental ya que no se requiere la etapa previa de electrodeposición del metal como pasa en el método *ex-situ*, pero en cambio está limitado a medidas de redisolución anódica donde se requiere una polarización negativa del electrodo para la preconcentración electrolítica de los analitos. Esta metodología presenta también limitaciones que afectan al rango del pH de las soluciones de medida, debido a que tanto el Bi(III) como el Sb(III) son

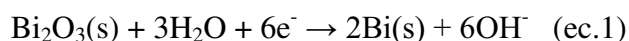
susceptibles a hidrólisis en medio neutro o alcalino. Aunque para el caso del bismuto se ha experimentado una deposición en un medio fuertemente alcalino ya que en estas condiciones el Bi(III) forma complejos estables con iones OH⁻. Estos complejos son solubles en medio acuoso y por tanto puede producirse la reducción electroquímica en la superficie del electrodo dando lugar a electrodos más sensibles [70].

Método *ex-situ*

En el caso de la electrodeposición vía *ex-situ* la preparación de la película de Bi o Sb en la superficie electródica se lleva a cabo en una celda independiente que contiene una disolución de bismuto [48,50,71] o de antimonio [66,67,72]. Este método consiste en formar la película antes de realizar las medidas. Para la electrodeposición de la película se recomienda un medio ácido (pH 4,5, ya que tanto el Bi(III) como el Sb(III) son fácilmente hidrolizables a pH más altos) y una concentración del ion metálico apropiada. En esta disolución se introduce el electrodo y se aplica un potencial de deposición durante un tiempo adecuado, bajo condiciones de agitación. El ion metálico se reduce a bismuto o antimonio metálico y queda electrodepositado sobre la superficie del electrodo. Una vez formada la película, el electrodo se introduce en otra celda que contiene la disolución de medida que contiene los analitos a determinar.

Método de modificación a partir de un precursor metálico

El método de formación de películas a partir de un precursor se ha descrito fundamentalmente para electrodos de bismuto, aunque también se puede aplicar a electrodos de antimonio [73–75]. La modificación de la superficie del electrodo tiene lugar durante el proceso de fabricación del electrodo, en el que se incorpora al sustrato un precursor del metal como pueden ser el óxido de bismuto (III), el citrato de bismuto (III) o el aluminato de bismuto (III), en el caso del antimonio se ha considerado el óxido de antimonio (III). Posteriormente al aplicar un potencial apropiado (en el caso del electrodo de óxido de bismuto alrededor de -1,0 V) el precursor se reduce a bismuto metálico en la superficie del electrodo.



La modificación del dispositivo es fácil de realizar y simplifica el experimento generándose una película de bismuto “*in-situ*” sin necesidad de utilizar sales de Bi(III).

Método de *sputtering*

La técnica de *sputtering* o pulverización catódica consiste en preparar el electrodo de trabajo depositando directamente el metal sobre un sustrato de silicio o de cerámica formando una película fina del metal [25,76–81]. Es una técnica de deposición física en fase vapor que se emplea para obtener capas delgadas que se aplica sobre todo en microelectrónica y óptica. Con esta técnica se lanzan partículas (generalmente iones acelerados por una diferencia de potencial) contra la superficie de un blanco, el cual como consecuencia libera átomos que lo abandonan para depositarse sobre un sustrato [25,82]. En este caso, la técnica consiste en preparar el electrodo de trabajo depositando directamente el bismuto o el antimonio sobre el sustrato de silicio o cerámica formando una película fina de bismuto o antimonio metálico.

La principal ventaja de este método, en comparación con los métodos de electrodeposición más tradicionales, es que no se requiere ni de disolución de Bi(III) ni de ningún sustrato conductor, por lo que el tiempo de análisis puede ser acortado y el proceso de fabricación simplificado [38]

3.3. Electrodo serigrafiados

Los métodos electroanalíticos convencionales basados en medidas voltamperométricas utilizan fundamentalmente los electrodos de mercurio, aunque tal y como ya se ha explicado anteriormente materiales alternativos al mercurio como el bismuto o el antimonio están siendo ampliamente utilizados. Por otro lado, la utilización de instrumentación convencional implica la realización de las medidas experimentales en el laboratorio.

La necesidad actual de desarrollar metodologías analíticas que permitan llevar a cabo medidas *in-situ*, utilizando instrumentación sencilla y portátil ha llevado al desarrollo de sensores o dispositivos de medida que se puedan adaptar fácilmente a equipos portátiles que permitan realizar medidas de campo sin perder las ventajas de los dispositivos

convencionales. La sustitución de estos electrodos más tradicionales por dispositivos que llevan impresos los electrodos es una alternativa que presenta muchas ventajas para este tipo de determinaciones *in-situ*. Dichos dispositivos contienen los electrodos de trabajo planos, así como los electrodos de referencia y auxiliar, los cuales están impresos sobre soportes mayoritariamente de plástico o de cerámica. Este dispositivo puede ser considerado como una celda electroquímica. La construcción de estos dispositivos se lleva a cabo normalmente mediante técnicas de serigrafiado, y se les conoce con el nombre de electrodos serigrafiados (SPE, *screen printed electrodes*).

Fue a partir de 1990 que la tecnología del serigrafiado se adaptó a la industria microelectrónica, ofreciendo la posibilidad de producir en masa sensores fiables a bajo coste y con una gran reproducibilidad [83]. La técnica del serigrafiado actualmente se ha establecido como un método fiable para la fabricación de sensores y biosensores electroquímicos tanto a nivel industrial como particular ya que hay laboratorios de investigación que preparan sus propios dispositivos [84].

Su carácter accesible y su bajo coste permiten, la producción de numerosas unidades altamente reproducibles.

Sobre el sustrato inerte (de plástico o cerámica) se imprimen los tres electrodos, incluyendo el electrodo de trabajo, el electrodo de referencia y el electrodo auxiliar. El electrodo de trabajo es el electrodo principal, en el cual las reacciones electroquímicas se llevan a cabo, mientras que el electrodo de referencia y el auxiliar son necesarios para completar el sistema electródico de la celda electroquímica [58]. Para el serigrafiado de los electrodos de trabajo se utilizan formulaciones de tintas comerciales de carbono o de metales como el oro o el platino [86], para el electrodo de referencia se suelen utilizar tintas de plata y para el electrodo auxiliar se suelen utilizar tintas de carbono o platino. Estas tintas se impregnan a través de diferentes plantillas con las geometrías deseadas. El diseño de la pantalla definirá el patrón que será impregnado sobre el sustrato inerte [87]. Las tintas de carbono están compuestas de partículas de grafito, un polímero aglutinante y otros aditivos (para dispersión, impresión y adhesión). Es importante tener en cuenta que la composición de la tinta (e.g. tipo o peso de las partículas de grafito), la impresión o las condiciones de curación, pueden afectar a la transferencia electrónica y al funcionamiento analítico del sensor resultante [86].

Después de la impresión de los electrodos se aplica un tratamiento térmico de curado adecuado a una determinada temperatura (80 °C-100 °C, según el tipo de tinta durante

unos 60 s) [86,88]. Seguidamente, se imprime una capa de aislante en una porción de la placa para definir el conjunto de electrodos y contactos eléctricos. Tras esta capa el dispositivo se somete al mismo proceso térmico (80° C durante 60 s). Las tintas de carbono son las más utilizadas ya que son más económicas, dan lugar a bajas corrientes de fondo, presentan una ventana de potencial amplia y pueden ser modificadas. En la Figura 6 se presenta un esquema orientativo de la fabricación de un electrodo serigrafiado de carbono [85,89].

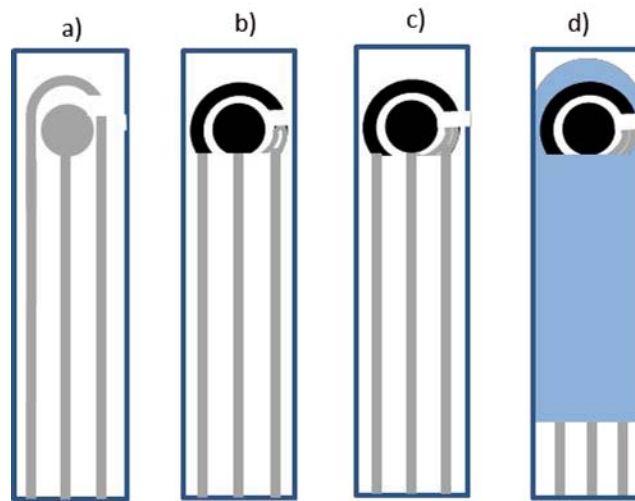


Figura 6. Fabricación general de un SPCE a) impresión de contactos de Ag sobre el sustrato de cerámica; b) impresión del electrodo de trabajo y electrodo auxiliar ambos de carbono; c) impresión de electrodo de referencia de Ag; d) capa de aislante.

En la actualidad se encuentra disponibles comercialmente una amplia variedad de este tipo de dispositivos. La gran versatilidad de los SPEs recae en el hecho que estos dispositivos pueden ser fácilmente modificados. La composición de las tintas se puede variar por adición de sustancias tales como metales, enzimas, polímeros, agentes complejantes, etc. Por otro lado, existe la posibilidad de modificación de los electrodos por medio de la deposición de sustancias sobre su superficie (películas de metal, polímeros, enzimas, etc.) [83].

De acuerdo con los tipos de materiales usados para modificar el electrodo de trabajo de los SPEs, estos se pueden clasificar en: *i)* SPE no modificados; *ii)* SPE modificados con películas de metales; *iii)* SPE modificados con enzimas y *iv)* SPE modificados con antígenos/anticuerpos [83].

Entre los SPEs no modificados se encuentran los electrodos serigrafiados de carbono (SPCEs), y los basados en películas de metales normalmente fabricados mediante el método de *sputtering*. En esta tesis doctoral se han considerado los SPCE, los cuales han sido modificados con bismuto o antimonio mediante métodos de electrodeposición *ex-situ*, *in-situ* o a partir de precursores del metal, así como el Bi_{sp}SPE y el Sb_{Sputtered} SPE. En la Figura 7 se presenta un esquema de clasificación de los SPEs utilizados en esta tesis y los métodos de formación de la película.

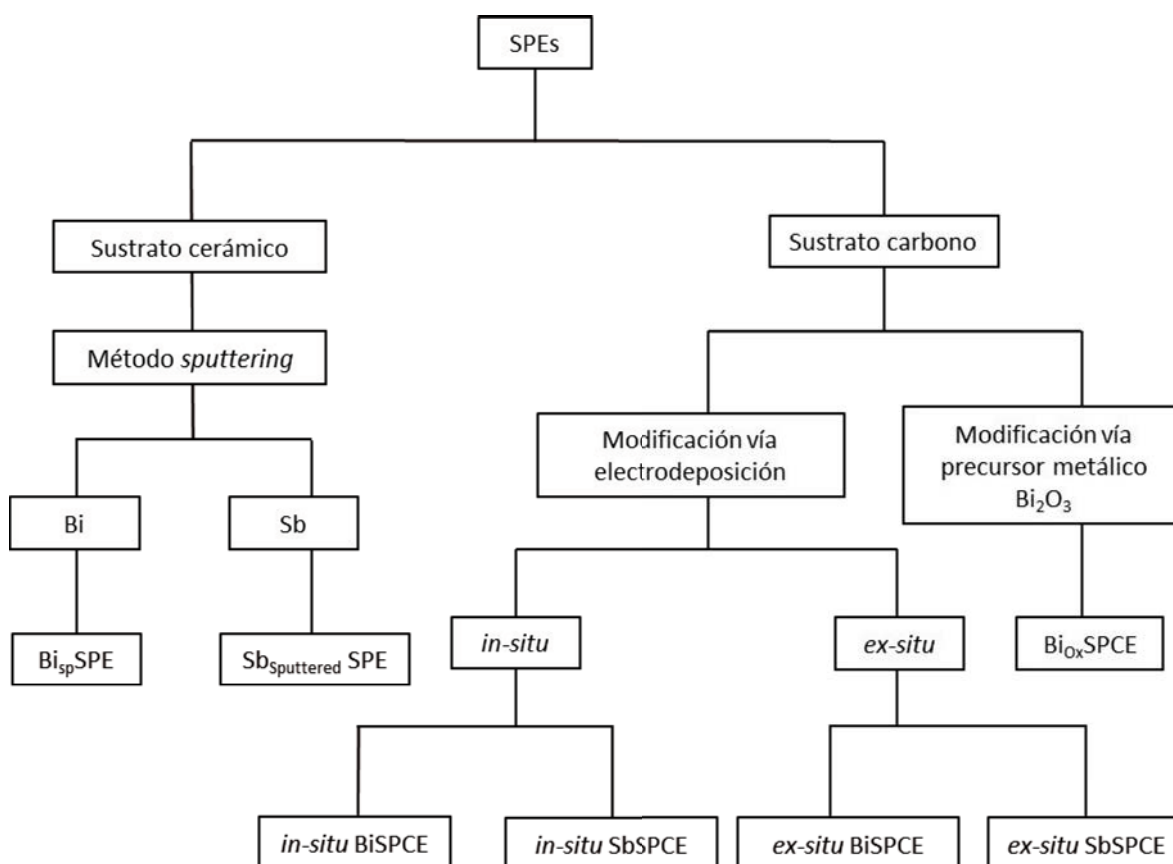


Figura 7. Clasificación de los SPE utilizados en esta tesis doctoral en base al sustrato y al método de modificación.

En la bibliografía existe un elevado número de referencias en las que se utilizan los SPEs no modificados. Entre los trabajos más relevantes cabe citar la determinación de procaína por análisis por inyección de flujo (FIA) utilizando el SPCE como detector amperométrico [90], la determinación de aurotiomalato (fármaco antirreumático) [91]; y la determinación de creatinina (para evaluación renal, muscular y disfunción de tiroides)

[92]. También se han reportado metodologías para la determinación de la vitamina B2 en matrices de alimentos por voltamperometría diferencial de impulsos [83], o la determinación de clorofila II por voltamperometría cíclica [93]. Otro campo de aplicación de estos dispositivos ha sido en la determinación de metales, a título de ejemplo se puede citar la determinación de Cu(II) en muestras de agua y suero bovino [94] y la determinación de Ag(I) en disoluciones fotográficas por SWASV [95].

Si se consideran los SPEs basados en metales, que se generan con tintas de metales como oro, plata, platino, bismuto o antimonio se han podido determinar Pb(II), Cu(II), Hg(II) y Cd(II) con SPEs de oro por SWASV [96,97], o Pb(II) con un SPE de plata también por SWASV [98]; o Ni(II) y Co(II) con un SPE de bismuto por SWAdSV [76,79].

Los SPCEs modificados con películas implican la formación de una película del metal en cuestión sobre el electrodo de trabajo, usualmente de carbono, por electrodeposición ya sea vía *in-situ*, *ex-situ* o a partir de un precursor como se ha explicado anteriormente. Los metales utilizados para modificar los SPCE pueden ser entre otros Hg, Au, Ni, Bi o Sb. Wang fue pionero en este campo modificando SPEs con mercurio para la determinación de metales como Pb(II), Cd(II) y Cu(II) a niveles de ppb por ASV, obteniendo resultados comparables a los obtenidos con un MFE, o con el HMDE [99,100]. A partir de estas investigaciones se han desarrollado diferentes modificaciones de SPEs para la determinación de metales en diferentes tipos de muestra.

Los SPEs también se pueden modificar con nanopartículas metálicas y con compuestos adsorbentes que permiten formar quelatos, pudiéndose determinar no sólo metales sino también otras moléculas [83]. Los SPCEs modificados con enzimas, se han utilizado en análisis medioambiental, para el análisis de pesticidas y herbicidas [101,102] y el análisis de metales [103,104]. Entre otras aplicaciones importantes se puede citar el análisis de glucosa [105], de colesterol [106], de etanol [107–109], o de compuestos fenólicos [110–112].

Se han desarrollado también SPEs basados en inmunosensores. Entre algunas de las aplicaciones se pueden citar la determinación de hormonas [113–115], de agentes infecciosos [116,117], toxinas en mariscos [118], carcinógenos [119], marcadores tumorales [120,121], anfetamina [122] o agentes patógenos en alimentos [123].

El diseño de los SPEs puede variar y pueden ser fabricados de acuerdo a la demanda de los usuarios. Las formas comunes incluyen un disco, un anillo o una banda, pero también se encuentran configuraciones en series de electrodos. En la Figura 8 se pueden ver, a título de ejemplo, algunos diseños; el convencional con un electrodo de trabajo, uno dual (dos electrodos de trabajo), uno adaptado a la placa ELISA y uno de series de electrodos.

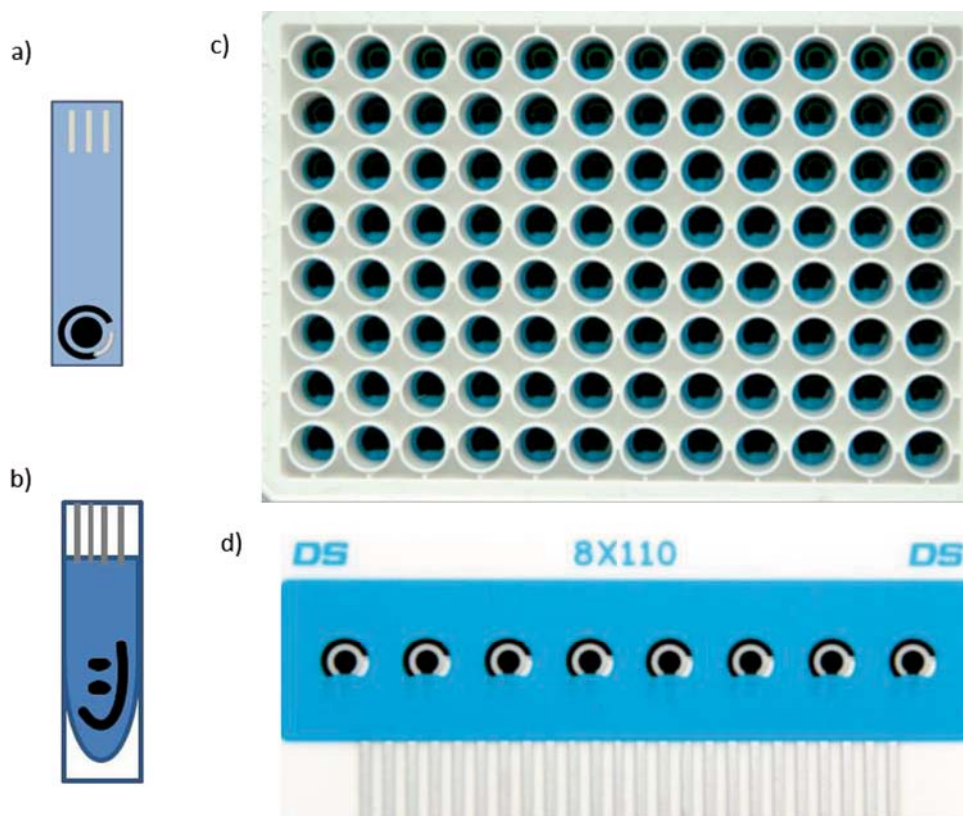


Figura 8. Algunos ejemplos de diseños de dispositivos serigrafiados: a) SPCE convencional con un único electrodo de trabajo; b) SPCE dual (dos electrodos de trabajo); c) SPCE adaptado a una placa ELISA; y d) SPCE series de electrodos. c) y d) adaptados de DropSens [124].

Como ejemplo se muestra en la Figura 9, el dispositivo (SPCE) que se ha utilizado en la presente tesis, para su posterior modificación con bismuto o antimonio. Es un electrodo de la casa DropSens, el cual consta de un electrodo de trabajo de carbono en forma de disco, un electrodo auxiliar de carbono y uno de referencia de plata que en realidad actúa de pseudoreferencia.

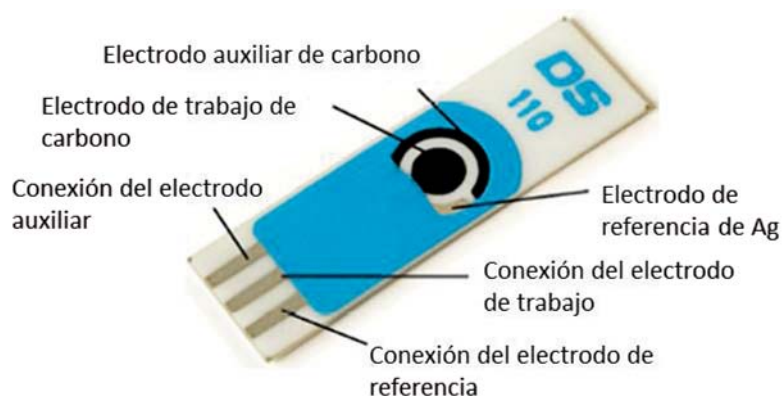


Figura 9. Electrodo serigrafiado de carbono. Adaptado de DropSens [124].

Actualmente hay muchas empresas que comercializan los SPCE, entre estas DropSens, PalmSens, Electrochemical Sensor Interface, Pine Research Instrumentation, DAQ, Metrohm y Micrux Technologies [125].

3.4. Estado actual de las investigaciones con electrodos serigrafiados de bismuto y antimonio

3.4.1. Electrodos serigrafiados modificados con bismuto

Los electrodos serigrafiados SPCE pueden ser modificados con Bi(III) por diferentes vías: i) *ex-situ*; ii) *in-situ*; iii) precursor; y iv) *sputtering*.

Los electrodos BiSPCE han sido utilizados principalmente en aplicaciones de determinación de metales pesados en muestras ambientales.

En el caso de las modificaciones vía *ex-situ* antes de la formación de la película de Bi, algunos autores recomiendan una etapa de acondicionamiento con el objetivo de oxidar las sustancias hipotéticamente absorbidas en la superficie de trabajo y así eliminar las trazas de analitos de la tinta de carbono. Este proceso de acondicionamiento es variable (i.e. aplicación de un potencial a 1 V durante 30 s) [126] o un ciclo condicional de impulso a 1,6 V por 120 s, seguido por un impulso a 1,8 V por 60 s en una disolución amortiguadora de acético/acetato 0,05 moles L⁻¹ de pH 4,6 [127,128].

Respecto a la formación de la película de bismuto, usualmente el SPCE se sumerge en la disolución amortiguadora de acético/acetato de pH 4,5, que contiene Bi(III) de 0,4 - 100 ppm, y se aplica un potencial en un rango de -0,3 V a -1,4 V durante un tiempo de deposición de 30 a 600 s, con agitación, algunas veces seguido de un periodo de reposo de 15 a 20 s. Para aumentar la resistencia mecánica de los electrodos serigrafados de carbono modificados con bismuto (BiSPCEs), estos pueden ser modificados o cubiertos con una membrana de nafion, utilizando una disolución de 0,5 a 1% de nafion [37].

La mayoría de estudios con *ex-situ* BiSPCE, se han enfocado a la cuantificación de Pb(II), Cd(II) y Zn(II) en diferentes muestras (e.g. agua de botella, agua de consumo humano, agua de río y cerámicas) por medio de técnicas de redisolución [35,127–129] Para este propósito las técnicas de redisolución (e.g. SWASV o DPASV y SCP) han sido las más utilizadas debido a sus excelentes LODs.

Un hecho relevante de los BiSPCE a diferencia del BiFE, es que no se produce desdoblamiento de picos en el intervalo de concentraciones de trabajo para ninguno de los metales Pb(II), Cd(II) y Zn(II) [130], y presenta mejor linealidad que el BiFE para estos tres metales. Estas mejoras podrían deberse a que la cobertura de la superficie del SPCE con el Bi es más uniforme (minimizando las interacciones con el sustrato) o que se forma una capa más fina que la del BiFE.

También se han determinado trazas de Cr(VI) en presencia de ácido diethylentriamina pentaacético de (DTPA) por AdSV, demostrando la conveniencia de este electrodo para determinar este metal [131].

En el caso de la modificación *in-situ* los iones Bi^{3+} se disponen en la misma disolución de medida, normalmente en un rango de concentración entre 250 y 2.500 ppb [38], de manera que el Bi es codepositado en el electrodo de trabajo del SPCE junto con los metales de interés [70,132–135]. La concentración de Bi debe ser al menos un orden mayor que la del metal a analizar, y el potencial y el tiempo de deposición dependen del analito a determinar [136]. En este caso también se aplican pretratamientos de la superficie del electrodo antes de la deposición del Bi, al igual que con el *ex-situ* BiSPCE.

Entre las principales aplicaciones del *in-situ* BiSPCE se encuentra la determinación de metales pesados, (Pb(II), Cd(II) y Zn(II)) en aguas naturales por técnicas ASV y SCP [70,132–135,137]. Además se ha reportado un método de inyección secuencial-SWASV

para la determinación simultánea de estos metales, con buena sensibilidad y reproducibilidad [138]. Los *in-situ* BiSPCE también han sido utilizados en un método analítico, que combina adsorción-desorción electroquímica y colorimetría, para determinar Pb(II), Cd(II) y Cu(II) en monitorizaciones ambientales [139]. También se ha reportado un estudio de biomonitorio de Cd(II) en saliva artificial y saliva humana por ASV [42]. Así como la determinación automática de Cd(II) en aguas naturales por SWASV en la que el electrodo está acoplado a un sistema de análisis de multi - jeringa de inyección por flujo (MSFIA, *multi-syringe flow injection analysis*), para la determinación de bajos niveles de concentración de Cd(II) [43]. El *in-situ* BiSPCE también se aplica a la determinación de Pb(II) en leche [142].

Entre las ventajas que presenta este electrodo, se cita la simplicidad experimental inherente al método *in-situ*. Sin embargo, también presenta desventajas como es la posibilidad de reacciones en la superficie del electrodo (entre el bismuto y otros metales o ligandos presentes en la muestra) que pueden interferir en los estudios de especiación; la limitación en el rango de pH de trabajo, debido a la tendencia de los iones Bi^{3+} a hidrolizarse en medios neutro o alcalinos. El *in-situ* BiSPCE es apropiado para medios moderadamente ácidos y altamente alcalinos, donde los complejos de hidróxido de bismuto son solubles y pueden ser reducidos en la superficie del electrodo [32,143]. A pesar de estas desventajas, estudios comparativos entre los electrodos *in-situ* BiSPCE y *ex-situ* BiSPCE demuestran que el *in-situ* BiSPCE proporciona señales más definidas que el *ex-situ* BiSPCE [128,133]. El *in-situ* BiSPCE presenta mayor sensibilidad y menor LOD en la determinación de Pb(II), de acuerdo con Calvo Quintana *et al.*, [70], esto se justifica por el hecho que con el método *in-situ* el bismuto y el plomo se depositan simultáneamente, lo cual conduce a una mayor depósito de Bi-Pb en toda la película del electrodo, mientras que con el *ex-situ* BiSPCE solamente en la capa externa de la película de bismuto se forma la aleación Bi-Pb, y como consecuencia presenta menor sensibilidad.

Varios estudios reportan la reutilización del mismo electrodo para diferentes análisis, tanto con electrodos SPCEs comerciales [133,144] como con electrodos fabricados por el usuario [141]. Otro aspecto importante a resaltar es que el estado de preservación de los SPCE es un factor significativo en el posterior comportamiento analítico de las películas de bismuto [136].

En el caso de la modificación de un SPCE con un precursor de Bi(III) el método consiste básicamente en modificar el SPCE durante el proceso de fabricación, mezclando la tinta de grafito con un precursor de Bi(III) (e.g. generalmente Bi_2O_3) e imprimiendo la mezcla sobre la superficie del SPCE. Posteriormente el precursor de Bi(III) es electroquímicamente reducido a Bi metálico [32,128,145–147].

Las principales aplicaciones del electrodo serigrafiado de carbono modificado con bismuto (III) (Bi_{Ox} SPCE) se han realizado en determinaciones simultaneas de Pb(II) y Cd(II) [46,143,147,148]; y Pb(II), Cd(II) y Zn(II) [145] en muestras de agua, extractos de suelos por SCP. El Pb(II) y el Zn(II) han sido determinados también en muestras de agua dulce y agua de mar por ASV [149].

La gran ventaja de este método es la simplificación del procedimiento experimental, ya que no requiere ningún proceso de electrodeposición previo o la presencia de una sal de bismuto para la preparación de la película. Sin embargo el Bi_{Ox} SPCE presenta algunas desventajas, entre las que cabe citar, el establecimiento del contenido óptimo de precursor de Bi(III), el montaje del Bi_{Ox} SPCE, y la optimización de parámetros de los estándares de impresión debido a la dureza y tamaño de las partículas. Las dificultades en la preparación del SPE pueden dar como resultado una falta de reproducibilidad, especialmente cuando la tinta de modificador de bismuto está hecha a mano [128,145,146].

En el caso de los electrodos de Bi vía *sputtering* se han realizado determinaciones de trazas de metales como Cd(II) y Pb(II) por SWASV y de Ni(II) por SWAdSV [150].

En otros estudios se realizó la determinación de Ni(II) [76] y Co(II) por SWAdSV [79] obteniéndose límites de detección muy bajos. Posteriormente el dispositivo se aplicó a la determinación independiente de Ni(II) [76] y Co(II) [79] en una muestra de agua de río certificada.

También se han aplicado a la determinación de Cd(II) y Pb(II) en fertilizantes fosfatados y en una muestra de agua de río certificada, obteniendo resultados comparables a estudios similares [77].

Igualmente se ha reportado un estudio con un microsensor con película de bismuto obtenida con el método de *sputtering*, que se aplicó a la determinación de Tl por SWASV en una muestra de agua de lago certificado [78].

De acuerdo con Kokkinos et. al., [76] las ventajas de este método de preparación de la película de bismuto comparada a las obtenidas por electrodeposición son las siguientes: *i)* se evita la utilización de soluciones de Bi(III), por lo cual el proceso experimental se simplifica ya que la electrodeposición Bi(III) *ex-situ* requiere un paso adicional de electrodeposición antes del análisis en una disolución separada que contiene Bi(III), mientras que la electrodeposición *in-situ* se lleva a cabo exclusivamente a potenciales negativos en medio ácido, debido a la hidrólisis del Bi(III) en medio alcalino y en soluciones neutras, *ii)* no es necesario un sustrato conductor, porque la cobertura de bismuto funciona como sensor del elemento y transductor de la señal; por lo que, las dificultades relacionadas con la selección del soporte apropiado, la preparación o inactivación de la superficie del sustrato se solventan; *iii)* los parámetros como la geometría del electrodo y el espesor de la película de bismuto se controlan fácilmente obteniéndose una cobertura de la superficie altamente reproducible, en contraste con la electrodeposición, en la que la calidad del depósito de bismuto depende fuertemente de las condiciones experimentales y del tipo de sustrato; y *iv)* esta tecnología ofrece la ampliación del alcance de la producción en masa de dispositivos desechables aunque su coste de producción es más elevado [150].

3.4.2. Electrodo serigrafiado modificado con antimonio

Una alternativa de los BiSPE son los electrodos serigrafiados con antimonio (SbSPE), aunque son pocos los estudios realizados con estos dispositivos para la determinación de iones metálicos y hasta la fecha no se han reportado estudios de la determinación de Cu(II) con este electrodo. Las principales ventajas de los electrodos de antimonio (SbFE) en comparación con las de bismuto (BiFE) es que la ventana de potencial útil para la realización de medidas es más amplia y su buen funcionamiento en medio ácido [33].

Entre algunos estudios importantes realizados con SbSPE se pueden citar los siguientes: un estudio comparativo en el que la película de Sb se ha realizado utilizando tres SPCEs, uno sin modificar y dos modificados durante su fabricación con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs, *multi-walled carbon nanotubes*) y el líquido iónico tetrafluoroborato de 1-butil-3-metilimidazolio ([Bmim] BF₄). La formación de la película de antimonio se realiza por electrodeposición *in-situ* y se estudia el comportamiento electroquímico de los tres electrodos en la detección del Hg(II) y Pb(II)

por SWASV en medio ácido. En este estudio se concluye que la sensibilidad del SbSPCE aumenta utilizando el modificador MWCNTs para la detección de Pb(II) y el ([Bmim]BF₄) para la determinación de Hg(II) [151].

Otro estudio ha sido la determinación de Pb(II) utilizando un SPCE modificado con Sb(III) y Bi(III) simultáneamente, para formar un electrodo serigrafiado de carbono modificado con película de bismuto y antimonio (Bi-SbSPCE) preparado vía *in-situ*. El Bi-SbSPCE proporciona una señal de redisolución del Pb(II) mejor en comparación con los BiSPCE, SbSPCE y con un electrodo de carbono vitrificado con película de bismuto y antimonio (Bi-SbGC) [152].

En otro trabajo se ha comparado la detección de Pb(II) y Cd(II) por DPASV, mediante un *in-situ* SbSPCE y un SbSPCE preparado por modificación con un precursor de antimonio. En la preparación de los electrodos de película de antimonio vía *in-situ* SbSPCE, se utilizaron dos medios diferentes, una disolución amortiguadora de acetato de pH 4,5 que contiene Sb(III) o una disolución de HCl (0,01 moles L⁻¹) que contiene Sb(III), para evaluar el medio más apropiado de medida. Con el método de modificación de electrodos con un precursor metálico, se prepararon tres electrodos utilizando tres precursores de antimonio diferentes, el Sb₂O₃, el Sb (C₂O₄) OH y el SnO₂/Sb₂O₅ para obtener los electrodos SbSPCE-Sb₂O₃, SbSPCE-(Sb^{III} (C₂O₄) OH) y SbSPCE-SnO₂/Sb₂O₅, respectivamente. Estos electrodos se aplicaron en el análisis de una muestra de agua mineral, a la cual se adicionó ferrocianida para evitar interferencias por el Cu(II). Los resultados indicaron que estos electrodos de antimonio eran comparables al *in-situ* BiSPCE y al Bi_{Ox}SPCE [73].

II

TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS Y QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS

II. TÉCNICAS VOLTAMPEROMÉTRICAS Y QUIMIOMÉTRICAS UTILIZADAS

4. Técnicas voltamperométricas

La invención de la polarografía en 1922 por J. Heyrovský representó un cambio cualitativo en la química electroanalítica. La contribución principal de esta técnica fue el reconocimiento de la importancia del potencial y su control, las oportunidades que ofrece mediante la medición de las corrientes limitantes y la posibilidad de extender los estudios electroquímicos a sistemas irreversibles. Un aspecto que hizo que la polarografía fuese una técnica pionera importante es que fue la primera técnica automatizada en los años treinta y principio de los cuarenta. La sensibilidad del método permitió la determinación de especies a concentraciones cerca de 10^{-5} mol L⁻¹. Aunque, la sensibilidad no fue suficiente para solucionar problemas analíticos que se plantearon en los años cincuenta y sesenta. Para alcanzar tal sensibilidad con las técnicas polarográficas basadas en medidas de corrientes farádicas, fue necesario minimizar el efecto de las corrientes de carga o capacitativas. Esto fue logrado exitosamente por Geoffrey Barker a finales de los cincuenta, quien introdujo las técnicas de onda cuadrada y de impulsos en electroanálisis. Las técnicas polarográficas de impulsos diferencial y de onda cuadrada minimizan las corrientes de carga y permiten el análisis de especies electroactivas en disoluciones de hasta 10^{-8} mol L⁻¹. Sin embargo, en los años setenta y ochenta se vio que estas técnicas aún eran insuficientes, particularmente para el análisis de muestras ambientales y biológicas. Esto condujo al desarrollo de las técnicas voltamperométricas de redisolución, en las que el analito es primeramente acumulado en la superficie del electrodo, normalmente de gota de mercurio o basado en mercurio, durante un tiempo adecuado, aplicando un valor de potencial constante. A continuación las especies acumuladas son redisueltas mediante la aplicación de un barrido de potencial de oxidación o de reducción obteniéndose una señal en forma de pico. Esta técnica tiene la capacidad de realizar medidas a niveles de concentración del orden de 10^{-10} o 10^{-11} mol L⁻¹.

Las principales ventajas de los métodos electroanalíticos son: *i)* La velocidad del análisis, un análisis puede llevarse a cabo, rutinariamente, en 3 minutos o incluso, si fuera necesario, en fracciones de segundos; esto es una ventaja cuando se deben analizar

un gran número de muestras ya que se ahorra tiempo. La velocidad es de particular importancia en el análisis de muestras que se deterioran o varían con el tiempo. *ii)* La selectividad, los métodos electroanalíticos son inmerecidamente percibidos como no selectivos, pero ofrecen alguna selectividad que algunas otras técnicas no presentan. Generalmente, se pueden determinar formas oxidadas en presencia de las correspondientes formas reducidas y viceversa; y haciendo el tratamiento adecuado de la muestra se puede determinar la concentración total, y de ambas medidas deducir la cantidad de especie reducida y la de especie oxidada. En mezclas multicomponentes se pueden determinar todos los compuestos simultáneamente siempre y cuando sus potenciales redox estén suficientemente separados. *iii)* Sensibilidad, las polarografías de impulsos diferencial y de onda cuadrada presentan límites muy bajos (10^{-8} mol L⁻¹), mientras que las técnicas de redisolución permiten realizar determinaciones a niveles de concentración de hasta 10^{-11} mol L⁻¹. *iv)* En estudios de especiación no sólo ofrecen información acerca del estado de oxidación del analito sino que también pueden informar de la forma química en la que se encuentra. En presencia de agentes complejantes es posible determinar el metal libre y el metal complejoado y se puede diferenciar entre complejos lábiles e inertes. *v)* Permiten el análisis de mezclas heterogéneas conteniendo materiales biológicos, proteínas, surfactantes así como coloides o partículas ligeramente solubles. Y *vi)* el coste de los instrumentos electroquímicos no es elevado. Además, cabe resaltar que los métodos electroanalíticos pueden ser utilizados en investigación básica y aplicada, así como en análisis rutinario [153,154].

En voltamperometría la información del analito se obtiene a partir de la medida de la intensidad de la corriente (de un electrodo de trabajo) en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización del electrodo de trabajo, donde tiene lugar la reacción de interés. El potencial de este electrodo sirve como fuerza impulsora para la reacción electroquímica, es decir, es el parámetro controlado que hace que las especies químicas presentes en una disolución sean reducidas u oxidadas en la superficie del electrodo. La intensidad de reducción u oxidación está controlada por el potencial aplicado, es decir, a medida que el potencial del electrodo se vuelve más negativo, el electrodo se vuelve un reductor más fuerte y viceversa. En la Figura 10 se muestran algunas de las funciones de potencial utilizadas en voltamperometría: a) barrido lineal, en la que el potencial aplicado a la celda aumenta linealmente en función

del tiempo y la intensidad de la corriente que se desarrolla en la celda se registra en función de este potencial aplicado; b) impulsos diferencial, en la que un impulso de potencial es aplicado al final de la vida de cada gota de mercurio en el caso de utilizar DME o SMDE (medidas polarográficas) o en el caso de utilizar electrodos sólidos, a intervalos de tiempo prefijados (medidas voltamperométricas); y c) triangular, en la que el potencial varía de forma cíclica entre dos valores, primero aumenta linealmente hasta un máximo y después disminuye linealmente con una pendiente del mismo valor numérico hasta su valor original, este proceso se puede repetir numerosas veces, registrándose la intensidad de corriente en función del tiempo [21,23].

La celda electroquímica utilizada en voltamperometría consta de un electrodo de trabajo, que es de pequeño tamaño para favorecer su polarización; un electrodo de referencia (e.g. Ag/AgCl) cuyo potencial permanece constante durante el experimento; y un electrodo auxiliar, generalmente de platino o de carbono. Se aplica el potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia y se mide la intensidad entre el electrodo de trabajo y el auxiliar.

En esta tesis se han utilizado diversas técnicas voltamperométricas, siendo la más utilizada la voltamperometría de redisolución anódica (ASV) aplicando en la redisolución un barrido de potencial de impulsos diferencial. Esta técnica se ha aplicado en la determinación de metales como cadmio, plomo y cobre en muestras de agua, utilizando electrodos serigrafiados modificados con bismuto (BiSPE) o con antimonio (SbSPE). Otra técnica voltamperométrica utilizada en esta tesis ha sido la voltamperometría cíclica (CV) y se ha utilizado básicamente para la caracterización de los procesos. En los estudios de complejación se ha utilizado la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV).

A continuación se hará una breve explicación de estas técnicas voltamperométricas.

4.1. Voltamperometría diferencial de impulsos

La voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) es una técnica muy utilizada para el análisis de especies orgánicas e inorgánicas a niveles de traza.

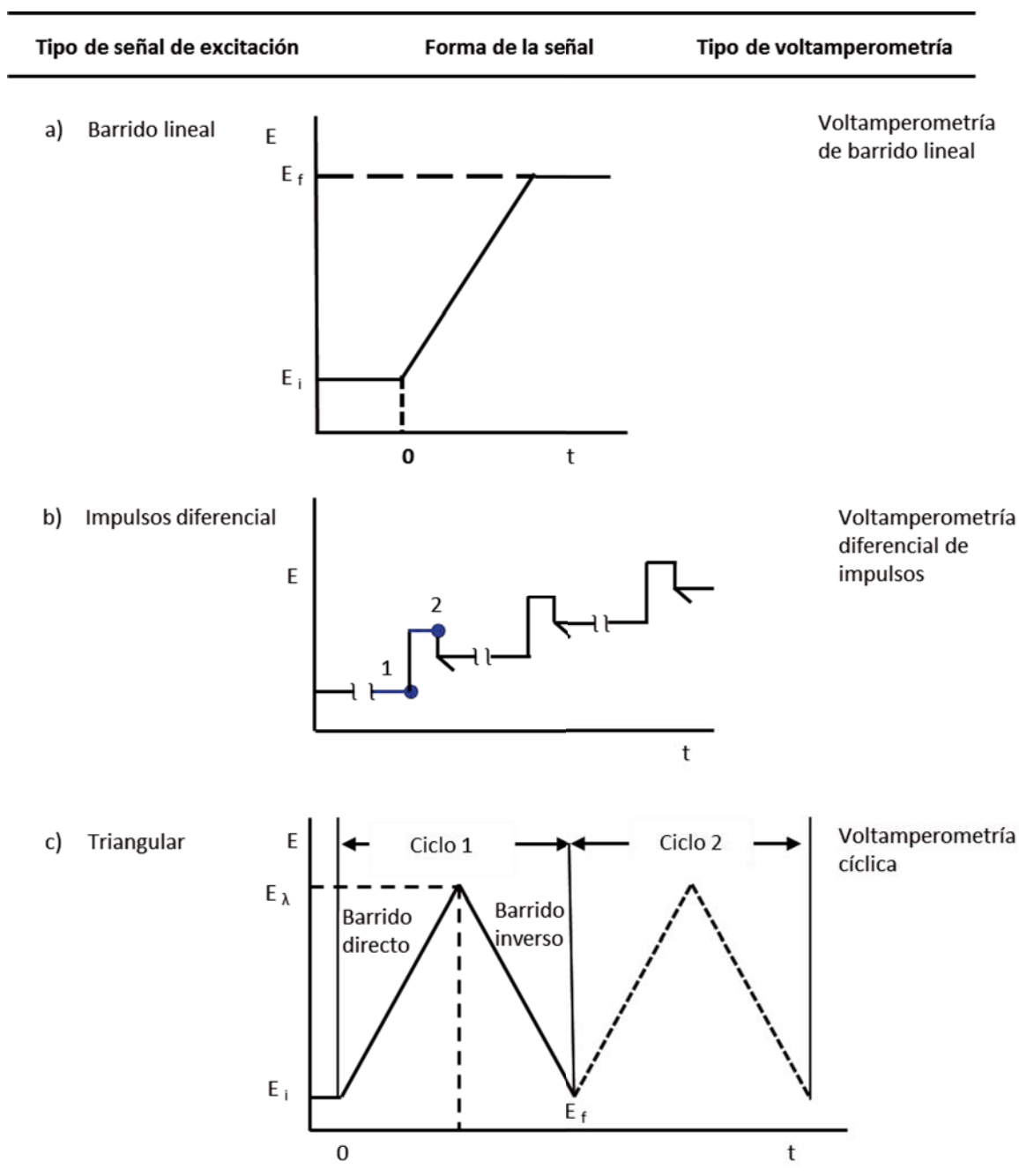


Figura 10. Funciones de potencial de excitación en función del tiempo utilizadas en voltamperometría, E_i es el potencial inicial, E_f es el potencial final, E_λ es el potencial de inversión, y t es el tiempo [23].

La señal de excitación aplicada en esta técnica es una rampa de potencial lineal a la que se han superpuesto impulsos de magnitud fija, los cuales son aplicados a un electrodo de trabajo a intervalos de tiempo perfectamente definidos. La Figura 10b muestra que la corriente se mide justo antes de la aplicación del impulso (1) y justo antes de que finalice (2). La primera corriente es instrumentalmente sustraída de la segunda y esta diferencia se representa frente al potencial aplicado. Esta manera de medir la corriente minimiza la contribución de la corriente de carga. La señal voltamperométrica resultante

son picos cuya altura es directamente proporcional a la concentración de los correspondientes analitos. Por otro lado, cuando el proceso es reversible, los picos son simétricos y presentan una anchura a media altura ($w_{1/2}$) que depende del impulso aplicado. Esta técnica permite realizar medidas de concentración de hasta $10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ debido a la minimización de la intensidad capacitativa y a que las medidas de diferencias de intensidades a potenciales tan próximos mejora considerablemente la relación señal-ruido [21].

4.2. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica (CV) es la técnica más utilizada para obtener información acerca de las reacciones electroquímicas y generalmente es uno de los primeros experimentos que se lleva a cabo en un estudio electroquímico. Tiene la capacidad de proveer información rápidamente sobre la termodinámica de los procesos redox, la cinética de las reacciones heterogéneas de transferencia de electrones y las reacciones químicas acopladas o sobre procesos de adsorción. Específicamente, ofrece una rápida ubicación del potencial redox de las especies electroactivas y la evaluación adecuada del efecto del medio en el proceso redox. En CV se aplica un barrido de potencial triangular (ver Figura 10c) a un electrodo de trabajo estacionario. Dependiendo de la información de interés, se puede realizar un único o múltiples ciclos voltamperométricos. Durante el barrido del potencial, el potenciostato mide la corriente resultante del potencial aplicado dando lugar a un voltamperograma cíclico. En la Figura 11 se ilustra la respuesta de una reacción redox durante un barrido de potencial cíclico; en este voltamperograma se asume que solamente la forma oxidada “O” está presente inicialmente. En consecuencia, en el barrido directo se selecciona un barrido de potencial catódico en la primera mitad del ciclo, comenzando desde un valor donde no se produce la reducción del analito. A medida que el potencial se aproxima al E° característico para el proceso redox, la corriente catódica comienza a aumentar, hasta que se alcanza un máximo. Después de pasar por la región del potencial en el cual el proceso de reducción tiene lugar, se invierte la dirección del barrido del potencial. Durante el barrido inverso, la corriente anódica comienza a aumentar, hasta que la especie “R” se vuelve a reoxidar a “O” produciendo un pico anódico [21].

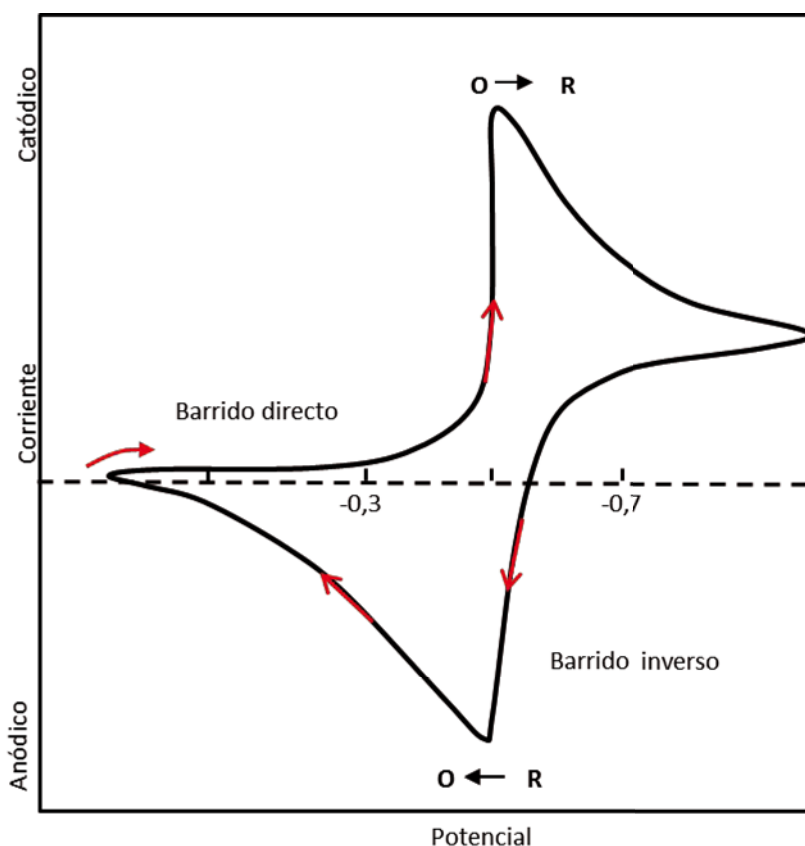


Figura 11. Voltamperograma cíclico típico para un proceso redox $O + ne^- \rightleftharpoons R$. Adaptado de [21].

4.3. Técnicas de redisolución

Los electrodos de trabajo utilizados en voltamperometría de redisolución pueden ser electrodos de mercurio, normalmente HMDE o MFE, o electrodos sólidos como los presentados en la sección 3.

Los tipos de voltamperometría de redisolución son la voltamperometría de redisolución anódica (ASV), la cronopotenciometría de redisolución (SCP), la voltamperometría de redisolución catódica (CSV) y la voltamperometría de redisolución con etapa previa de adsorción (AdSV).

El tipo de voltamperometría de redisolución más comúnmente utilizada para análisis de metales es la ASV y será la técnica empleada mayoritariamente en esta tesis. Hay metales que no se pueden determinar por ASV y su determinación se lleva a cabo por AdSV.

La técnica voltamperométrica de redisolución anódica comprende tres etapas:

- 1) Preconcentración: en la que se realiza la electrodeposición catódica del analito o analitos de la disolución en la superficie del electrodo de trabajo, aplicando un potencial controlado durante un tiempo determinado. El potencial de deposición es usualmente unos 0,5 V más negativo que el potencial de reducción del metal más fácilmente oxidable. Esta etapa de preconcentración se lleva a cabo con agitación de la solución y el transporte de materia tiene lugar por difusión y convección.
- 2) Reposo: en el que se sigue aplicando el mismo potencial de deposición pero sin la agitación mecánica.
- 3) Redisolución: es la etapa de medida, en la que se disuelve total o parcialmente el depósito de analito acumulado sobre el electrodo, aplicando un barrido de potencial anódico.

En la Figura 12 se representan de forma esquemática las etapas de la ASV.

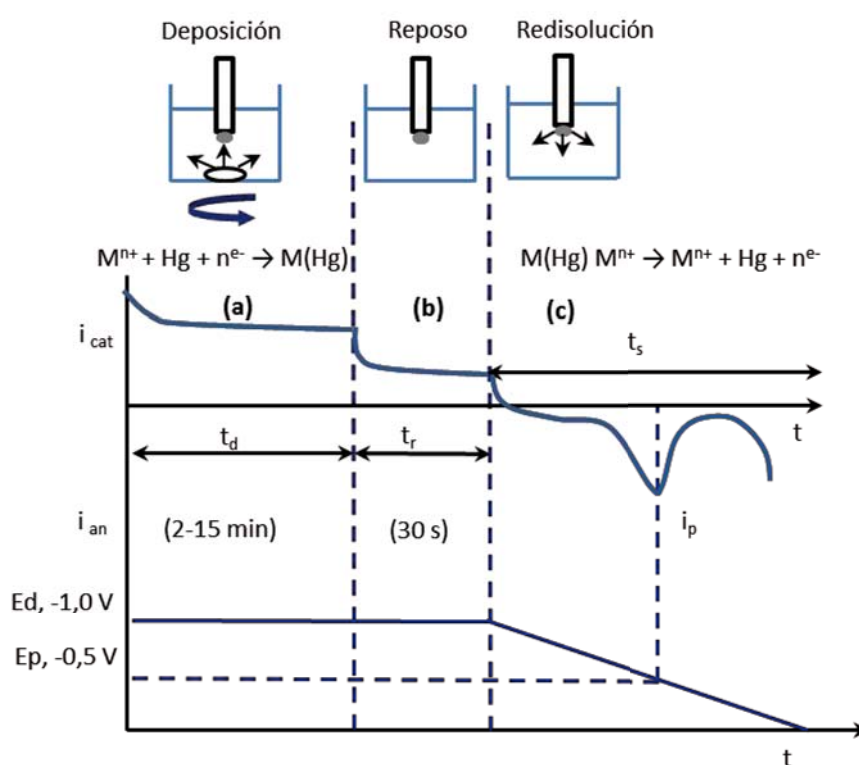


Figura 12. Etapas de la voltamperometría de redisolución anódica en un HMDE a) deposición; b) reposo; y c) redisolución; donde i_{an} es la corriente anódica, i_{ca} es la corriente catódica, E_d es el potencial de deposición, i_p es la intensidad del pico, t_s el tiempo de redisolución, t_d el tiempo de deposición, t_r el tiempo de reposo y t el tiempo total. Adaptado de [23].

Durante la etapa de redisolución, el barrido de potencial puede llevarse a cabo aplicando cualquier función de potencial, incluyendo barrido lineal, diferencial, de impulsos, onda cuadrada o corriente alterna.

El comportamiento que gobierna la respuesta voltamperométrica durante la etapa de redisolución depende de varios parámetros relacionados con la deposición y la redisolución, así como de las características del ion metálico y de la geometría del electrodo empleado. Por ejemplo, para un MFE la corriente de pico viene dada por la siguiente ecuación:

ec. (2)

$$i_p = \frac{n^2 F^2 v^{1/2} A l C_{Hg}}{2.7 RT}$$

Donde A y l son el área y espesor de la película respectivamente, v es la velocidad del barrido del potencial, n es el número de electrones, F es la constante de Faraday, C_{Hg} es la concentración del metal en la amalgama, R es la constante de gas, y T es la temperatura absoluta. Para el HMDE la corriente del pico de redisolución viene dada por la siguiente ecuación:

ec. (3)

$$i_p = 2.72 \times 10^5 n^{3/2} A D^{1/2} v^{1/2} C_{Hg}$$

Donde A es el área de la superficie y D es el coeficiente de difusión. Los parámetros instrumentales que se deben controlar en la etapa de preconcentración son el potencial de deposición, el tiempo de deposición, la velocidad de agitación y el tamaño de la gota, en el caso de utilizar un HMDE. El potencial de deposición debe ser más negativo a medida que disminuye el potencial redox del metal que se deposita. El tiempo de deposición, debe ser cuidadosamente controlado; en general a mayor tiempo de deposición mayor cantidad de analito se depositará en la superficie del electrodo, pero periodos largos pueden conducir a la formación de compuestos intermetálicos, la saturación del electrodo, etc. La agitación favorece la etapa de preconcentración debido a que facilita el transporte convectivo de los iones hacia la superficie del electrodo de trabajo. La sensibilidad y la precisión de las medidas dependen, en gran medida, de la

efectividad del sistema hidrodinámico, ya que éste influye sobre la cantidad de analito depositado, por lo que un aumento de la velocidad de agitación, provoca un mayor gradiente de concentración en la superficie del electrodo y un incremento de la intensidad que fluye, lo que produce un aumento de la cantidad de metal depositado [20,23].

5. Electrodo de trabajo

En esta tesis los estudios voltamperométricos se llevaron a cabo utilizando básicamente tres tipos de electrodos de trabajo: a) HMDE, b) electrodos serigrafiados modificados con bismuto (BiSPE), y c) electrodos serigrafiados modificados con antimonio (SbSPE).

Los electrodos serigrafiados utilizados fueron de tres tipos diferentes en función del método utilizado para la formación de la película del metal. Algunos de los dispositivos se obtuvieron modificando con bismuto o antimonio electrodos serigrafiados de carbono SPCE vía *in-situ* o *ex-situ*; en este caso los electrodos fueron los que a partir de ahora llamaremos BiSPCE o SbSPCE según la modificación. Otros de los dispositivos fueron los electrodos serigrafiados de carbono modificados con óxido de bismuto (III) (Bi_{Ox}SPCE) los cuales se adquieren comercialmente, y por último los electrodos comerciales obtenidos vía *sputtering* de bismuto (Bi_{sp}SPE) y antimonio (Sb_{Sputtered} SPE). En la Tabla 2 se detallan los electrodos de trabajo utilizados y el método de modificación del electrodo serigrafiado para obtener la película del metal así como el sustrato.

Tabla 2. Electrodo de trabajo utilizados.

Tipos de electrodos	Método de formación de la película	Sustrato
BiSPCE	<i>In-situ</i>	Carbono
BiSPCE	<i>Ex-situ</i>	Carbono
SbSPCE	<i>In-situ</i>	Carbono
SbSPCE	<i>Ex-situ</i>	Carbono
Bi _{Ox} SPCE	Modificado con precursor (Bi ₂ O ₃)	Carbono
Bi _{sp} SPE	<i>Sputtering</i>	Cerámica
Sb _{Sputtered} SPE	<i>Sputtering</i>	Cerámica

6. Técnicas quimiométricas

Las valoraciones voltamperométricas realizadas en el estudio de complejación de Cd(II)-ligando fueron tratadas con el método de resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) y por el método de ajuste de pico gaussiano (GPA, *Gaussian Peak Adjustment*). Sin embargo, el tratamiento MCR-ALS ofreció una resolución más adecuada y satisfactoria para el estudio de complejación Cd^{2+} :GSH y Cd^{2+} :PC₂ que el obtenido aplicando el tratamiento GPA.

6.1. Resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)

EL MCR-ALS es un método desarrollado por Tauler *et al.* [155] que ha demostrado ser una herramienta poderosa en estudios espectroscópicos de equilibrios de complejación. Posteriormente este método ha sido aplicado a estudios de complejación por técnicas voltamperométricas, para lo cual se tuvieron que introducir algunas modificaciones para adaptar el método a las características de los datos voltamperométricos [156].

En MCR tiene lugar la descomposición matemática de la matriz experimental de datos **I** (nF, nC) en un producto de dos matrices abstractas ortogonales **C** (nF, nS) y **V^T** (nS, nC) para un número preseleccionado de componentes nS. **C** y **V^T** contienen los perfiles respuesta de cada componente asociados, respectivamente a la variación de las filas y de las columnas de la matriz inicial de datos **I**. Matemáticamente, esta descomposición puede expresarse como:

ec. (4)

$$\mathbf{I} = \mathbf{C}\mathbf{V}^T + \mathbf{X}$$

Donde **X** es la matriz residual que expresa en términos de falta de ajuste la varianza no explicada por **C** y **V^T**. El exponente **T** indica que la matriz **V** se obtiene de forma traspuesta.

Es importante aclarar que en este caso, el concepto de componente se define como cualquier entidad que da una respuesta pura que sea distintiva y real. Esto puede incluir

cualquier especie química de un sistema pero que en el caso de datos voltamperométricos el término componente está asociado a los diferentes procesos electroquímicos que tienen lugar, pero también pueden asociarse a fenómenos físicos como la adsorción electródica o la carga de la doble capa. Asimismo, en el caso de medidas voltamperométricas una misma especie química puede proporcionar más de una respuesta instrumental.

El proceso de optimización de las matrices $\mathbf{C}$ y $\mathbf{V}^T$ se lleva a cabo de manera iterativa mediante mínimos cuadrados alternados (ALS, *alternating least squares*) a partir de una estimación inicial de $\mathbf{C}$ o $\mathbf{V}^T$. Ambas matrices entran en un ciclo iterativo sin que ninguna tenga prioridad sobre la otra, finalizando el proceso al cumplirse un criterio de convergencia definido como el valor límite de la matriz $\mathbf{X}$ o como un número máximo de iteraciones [155,157].

En este proceso de ALS se introduce toda la información basada en el conocimiento que se tiene sobre la estructura interna de los datos y de las características químicas del sistema. Esta información se introduce en forma de restricciones que proporcionan un significado químico a los datos obtenidos. Finalmente se obtienen las matrices $\mathbf{C}$ como la matriz de la distribución de concentraciones y $\mathbf{V}^T$ como la matriz de vectores respuesta unitarios (voltamperogramas) de cada componente.

Después de llevarse a cabo la factorización, se realiza el análisis de las matrices resultantes, lo que nos permite obtener las posibles estequiometrías de los complejos formados, la estabilidad relativa de los enlaces de los iones metálicos con el ligando, así como algunas indicaciones sobre la reversibilidad de los diferentes procesos electroquímicos, los cuales permiten deducir una secuencia de complejación para el sistema aplicado. Las etapas del tratamiento quimiométrico de datos correspondientes a valoraciones complexométricas son: a) organización de los datos experimentales; b) suavizado y corrección de la línea base; c) estimación del número de componentes del sistema; d) estimación inicial de la matriz de $\mathbf{C}$ o $\mathbf{V}^T$; e) introducción de restricciones; y f) factorización de la matriz experimental $\mathbf{I}$.

Este proceso se lleva a cabo en el entorno Matlab [156].

Creación de la matriz de datos

Se registran los voltamperogramas a diferentes relaciones metal:ligando. Los datos obtenidos experimentalmente se estructuran en un vector de potenciales y en una matriz de intensidades que contienen todos los voltamperogramas obtenidos a las diferentes relaciones metal:ligando. Estos datos son finalmente transferidos al entorno de Matlab.

Suavizado de medidas y corrección de la línea base

Las matrices de intensidades suavizadas generalmente conllevan una falta de ajuste menor cuando se descomponen durante el proceso iterativo, no obstante, en ocasiones, esta corrección puede dificultar la diferenciación de componentes si sus vectores respuesta unitarios son excesivamente similares. Este proceso puede llevarse a cabo por el programa *destral*, el cual corrige primero puntos que se desvían más de un 5% en la dirección vertical del continuo del escaneado, aunque dicho parámetro se puede modular. Posteriormente se puede utilizar el filtro Savitzky-Golay, el cual ajusta diferentes polinomios a grupos de unos pocos puntos y tiende a preservar mejor las características iniciales (e.g. máximos, y mínimos relativos o el ancho de los picos).

En el caso de los estudios complexométricos por voltamperometría, se puede corregir la línea base mediante el programa *baseline* que crea una nueva línea base a partir del ajuste de un polinomio a los puntos marcados manualmente sobre la matriz experimental. Cuando la línea base es sencilla, la corrección se realiza sobre la matriz **I** entera con una deriva aceptable e igual durante toda la valoración; en caso contrario, la corrección se deberá realizar voltamperograma por voltamperograma, siempre con cuidado de no introducir artefactos en la matriz resultante, debido a que dificulta la resolución correcta del análisis quimiométrico. Si después de la corrección de la línea base algún valor de intensidad es ligeramente negativo, su valor se hace cero con el programa *negtozero*.

Estimación del número de componentes

El número de componentes n_S necesarios para explicar la variabilidad de la matriz **I**, está asociado con sus valores singulares, los cuales se obtienen mediante el algoritmo descomposición de valores singulares (SVD, *singular value decomposition*) el cual

descompone la matriz $\mathbf{I}$ en una matriz diagonal cuyos elementos, no negativos y presentados en orden decreciente, son sus valores singulares [158]. Primeramente la estimación se efectúa visualmente, a partir de la representación del vector que contiene los valores singulares. Si no existe pérdida de linealidad de los datos electroquímicos, deriva de la línea base u otras interferencias de tipo físico, como la adsorción electródica, los valores singulares más significativos se pueden asociar a especies químicas diferentes o a procesos electroquímicos diferentes.

Estimación inicial

En medidas voltamperométricas, la construcción de la matriz $\mathbf{V}_0^T$ inicial es lo más recomendable y se lleva a cabo mediante el programa *peakmaker* desarrollado por el grupo de Electroanálisis [159]. Este programa permite dibujar en la pantalla del ordenador, un voltamperograma teórico para cada uno de los componentes escogidos, que sigue funciones de tipo gaussiano.

6.2. Restricciones

Se define restricción como cualquier propiedad matemática o química que se cumple de manera invariable en todo el sistema en estudio o para alguno de sus componentes puros [160]. Las restricciones son implementadas en Matlab como lenguaje matemático y sirven para minimizar la ambigüedad de los resultados obtenidos, al forzar la optimización de las matrices $\mathbf{C}$ y $\mathbf{V}^T$ de acuerdo a las condiciones deseadas.

En la Figura 13 se muestra un diagrama de flujo esquemático de la aplicación del MCR-ALS a los datos voltamperométricos.

Las restricciones más usadas aplicadas a datos voltamperométricos son:

- a) **No negatividad:** Obliga a que cualquier valor de un perfil respuesta sea positivo durante el proceso iterativo. Se aplica a todos los perfiles de concentración y a muchas respuestas experimentales como los voltamperogramas.

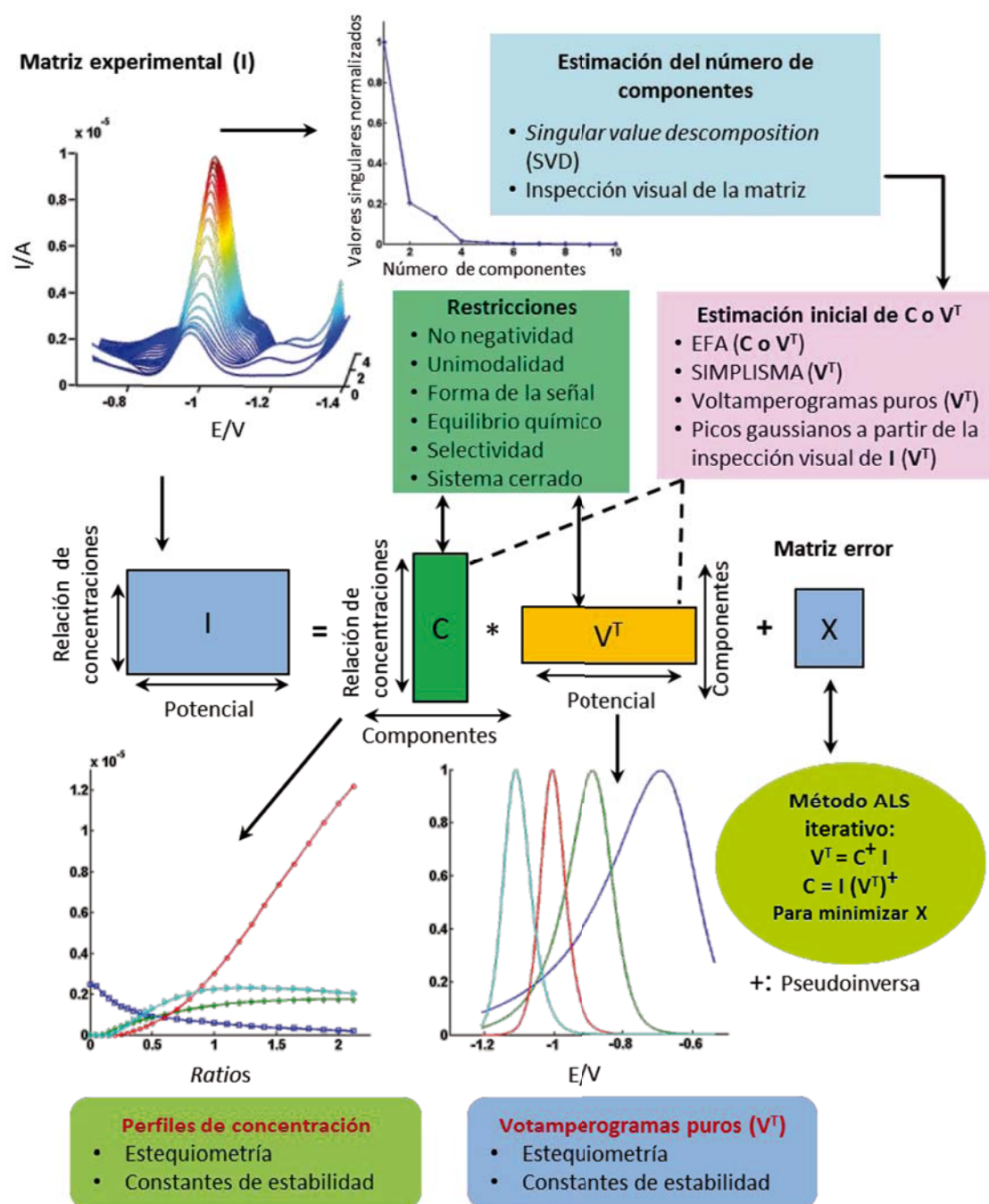


Figura 13. Diagrama de flujo de la aplicación del método MCR-ALS a datos voltamperométricos de complejación.

- b) **Unimodalidad:** Impone la existencia de un único máximo a cada perfil de respuesta. Se aplica a los voltamperogramas para asegurarse de que no contengan hombros o dobles picos de altura superior a un determinado grado de libertad, normalmente un 5% del valor máximo.
- c) **Crecimiento/decrecimiento monotónico:** Se aplica a aquellos componentes cuyos perfiles de concentración sean crecientes o decrecientes desde su origen hasta el final de la valoración. Para asegurar la tendencia, se calcula para cada punto la primera derivada mediante el método de Savitzky-Golay y se restringe su signo. En caso de que un punto tenga la derivada de signo contrario al anterior, se igualan sus valores.
- d) **Restricción de forma:** Se aplica a la matriz de voltamperogramas unitarios para que estos se ajusten a una ecuación paramétrica determinada que se optimiza en cada nueva iteración. Estas funciones de pico describen, como es natural, la forma típica de los voltamperogramas diferenciales sin basarse en parámetros electroquímicos, sino puramente numéricos [161].
- e) **Equilibrio químico:** Se basa en el ajuste de una serie de constantes de complejación a los perfiles de concentración que son obtenidos sucesivamente mediante ALS. La aplicación de esta restricción sí requiere la presunción de un posible modelo de complejación como, por ejemplo, el número y la estequiometría de los complejos que se forman, así como la estimación inicial del valor de sus constantes de complejación [162].
- f) **Sistema cerrado:** Es la aplicación de un balance de materia, por lo que se necesita que todas las especies existentes sean detectables mediante la técnica de estudio. En voltamperometría, esto significa que todas las especies que contienen un determinado analito (M y/o L) son electroactivas, y que la suma de sus concentraciones en cada paso de la valoración es constante.
- g) **Selectividad:** Está relacionada con la estructura interna de los datos y no con la naturaleza química del sistema. Esta restricción hace referencia a aquellas zonas de las matrices $\mathbf{C}$ o $\mathbf{V}^T$ donde sólo un componente está presente como, por ejemplo, el principio de una valoración.

Estas restricciones son muy importantes en el proceso iterativo para encontrar la solución correcta, por lo cual su aplicación debe ser siempre prudente y válida.

6.3. Metodologías MCR para el tratamiento de datos no lineales

El MCR-ALS está condicionado a la linealidad de los datos. No obstante, la complejidad de la naturaleza de los datos voltamperométricos, la cinética de las reacciones electroquímicas y la ventana de tiempo de la medida son algunos de los factores que pueden afectar dramáticamente dicha linealidad. La cinética de las reacciones electroquímicas puede modificarse por el pH y la fuerza iónica. Además los cambios durante los procesos de reducción de las especies pueden conducir a un cambio en el potencial y además a un ensanchamiento de las señales, y por lo tanto, a una pérdida de linealidad, la cual se traduce en un aumento de la falta de ajuste (*lof*, *lack of fit*) y del número de componentes necesarios para explicar el comportamiento del sistema.

Estos comportamientos no lineales dificultan o imposibilitan la aplicación del MCR-ALS y la correcta resolución de los datos.

Para solventar estos tipos de problemas se desarrolló en el grupo de investigación un programa, denominando *shiftfit* [163,164], que permite corregir los desplazamientos de potencial y de esta manera obtener una matriz de datos lineales para la posterior aplicación de la metodología MCR-ALS.

Posteriormente al *shiftfit* se desarrolló el *pHfit* [165]. Esta metodología permite el tratamiento mediante resolución de curvas multivariante (MCR) de datos voltamperométricos no lineales, correspondientes a valoraciones de mezclas metal-ligando en función del pH cuyas señales se desplazan progresivamente en el eje de potencial debido a la evolución de los complejos con el pH.

En los casos donde la pérdida de linealidad de los datos es muy pronunciada como para no poder aplicar directamente MCR-ALS, los datos se podrían tratar con programas y metodologías como *shiftfit* y *pHfit* si las señales al desplazarse mantienen su forma a lo largo de todo el experimento. Pero en muchos casos los cambios en la forma o simetría de las señales unitarias (típicamente causados por una disminución progresiva de la reversibilidad electroquímica) provocan un aumento dramático de la no linealidad, que no puede ser tratada ni por *shiftfit*, ni *pHfit*. Por lo cual, el grupo de electroanálisis desarrolló el algoritmo GPA [166], el cual se basa en el ajuste paramétrico de señales (PSF, *Parametric signal fitting*) a través de funciones que puedan reproducir la forma

de éstas. Este método ajusta dos funciones gaussianas, una a cada lado de la señal, y sus parámetros se optimizan por mínimos cuadrados. Estos parámetros determinan no sólo la altura y la posición de las señales (como en los algoritmos anteriores), sino también la anchura a media altura a ambos lados. Este doble ajuste de la señal permite solucionar anticipadamente la aparición de picos asimétricos. Es importante señalar que, a diferencia de *shiftfit* y *pHfit*, el uso de funciones gaussianas restringe la aplicación del GPA a las señales en forma de pico.

El GPA fue aplicado al estudio de complejación Cd(II)-ligando, sin embargo el método no brindó información precisa sobre el sistema.

III

EXPERIMENTAL

III. EXPERIMENTAL

7. Instrumentación y reactivos

7.1. Instrumentación

Los estudios voltamperométricos se llevaron a cabo utilizando diferentes electrodos de trabajo de bismuto o antimonio modificando electrodos serigrafiados de carbono SPCEs vía *in-situ* o *ex-situ*, o utilizando electrodos serigrafiados de óxido de bismuto (III), y electrodos obtenidos vía *sputtering* de bismuto o antimonio, todos ellos de la casa DropSens (España). En la Tabla 3 se detallan los diferentes tipos de electrodos serigrafiados, el diámetro del electrodo de trabajo y la referencia comercial de cada uno de ellos.

Tabla 3. Electrodos serigrafiados utilizados en las tesis.

Tipo de electrodos	Referencia SPEs	Diámetro (mm)
SPCE	DRP-110	4
Bi ₂ O ₃ SPCE	DRP-110BI	4
Bi _{sp} SPE	DRP-BI10	4
Sb _{sputtered} SPE	DRP-SB10	4

Como electrodos de referencia y auxiliar se utilizaron electrodos externos y no los incorporados en los dispositivos serigrafiados. Se utilizó un electrodo de referencia de Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹) y un electrodo auxiliar de platino (ambos de Metrohm, Suiza). El equipo utilizado para las medidas fue un Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie, Holanda), conectado a un Stand Metrohm 663 VA (Metrohm, Suiza) y a un ordenador con software GPES versión 4.9 (EcoChemie, Holanda). Los electrodos serigrafiados se conectaron al potenciostato a través de un cable flexible (DropSens, España). Se usó un pH-metro Crison micro pH 2000 y un conductímetro Orion 120 conectado a una celda conductimétrica 99-01-01(constante de celda 1,03 cm⁻¹) para las medidas de pH y conductividad.

Todas las medidas se llevaron a cabo en una celda de vidrio a temperatura ambiente (20 °C) en presencia de nitrógeno puro (Linde N50) para evitar la oxidación de las especies a estudiar. En la Figura 14 se muestra el equipo y los electrodos utilizados.

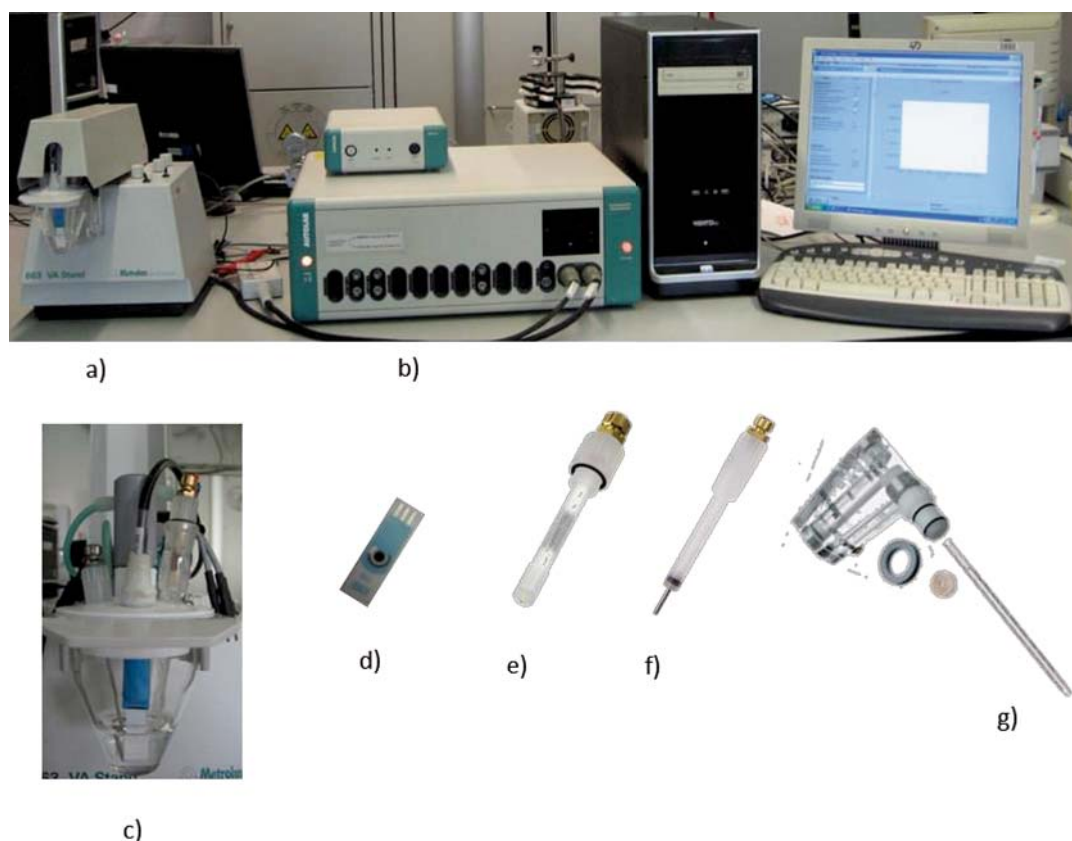


Figura 14. Equipo y electrodos, a) *Stand* Metrohm 663VA; b) Autolab *System* PGSTAT12; c) Celda electroquímica; d) SPE; e) Electrodo de referencia Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹); f) Electrodo auxiliar de platino; y g) Electrodo multimodo de gotas de mercurio.

7.2. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico o suprapuro procedentes de las casas comerciales Fluka, Merck o Panreac. Todas las disoluciones utilizadas se prepararon a partir de los reactivos detallados en la Tabla 4 utilizando agua ultrapura del equipo Milli-Q plus 185 *system*, marca Millipore.

Tabla 4. Reactivos químicos utilizados.

Nombre	Formula	Marca
Acetato de sodio trihidratado	$C_2H_3O_2Na \cdot 3H_2O$	Merck
Ácido acético	$C_2H_4O_2$ al 100%	Merck
Ácido clorhídrico	HCl	Merck
Ácido maleico	$C_4H_4O_4$	Fluka
Ácido nítrico	HNO_3 al 65%	Merck
Cloruro de potasio	KCl	Merck
Glutati6n	(γ -Glu-Cys-Gly) (GSH)	Merck
Hidróxido de potasio	KOH	Merck
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck
Material de referencia certificado agua subterránea BCR® 610		Sigma -Aldrich
Nitrato de cadmio tetrahidratado	$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Merck
Nitrato de cobre trihidratado	$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	
Nitrato de plomo tetrahidratado	$Pb(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Merck
Nitrato de potasio	KNO_3	Merck
Patr6n de Bi (III) 1000 mg L ⁻¹	Estándar de Bi para AAS (5 % HNO_3)	Fluka
Patr6n de Sb (III) 1000 mg L ⁻¹	Sb_2O_3 en HCl (2 mol L ⁻¹)	Merck
PC ₂ , fitoquelatina de dos unidades	(γ -Glu-Cys) ₂ -Gly 95% de pureza	Genosphere biotechnologies
Sal dis6dica del EDTA	$C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8 \cdot 2H_2O$	Merck
Tris (hidroximetil) aminometano	$H_2NC(CH_2OH)_3$	Merck

8. Procedimientos experimentales

8.1. Preparación de los electrodos serigrafiados de bismuto y antimonio

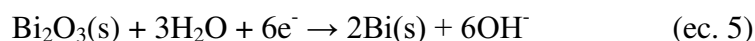
Para los estudios realizados con BiSPEs se utilizaron cuatro electrodos diferentes: *i) in-situ* BiSPCE; *ii) ex-situ* BiSPCE; *iii)* Bi_{OX}SPCE; y *iv)* Bi_{sp}SPE y para el estudio realizado con los SbSPE se utilizaron tres tipos de electrodos: *i) in-situ* SbSPCE; *ii) ex-situ* SbSPCE; y *iii)* Sb_{Sputtered} SPE. Alguno de estos electrodos necesita un paso de preparación previo a las medidas experimentales como es el caso de los electrodos preparados *ex-situ* y el de los preparados a partir de un precursor. A continuación se detalla la preparación de cada uno de ellos.

1. *Ex-situ* BiSPCE

Los electrodos SPCE, de referencia y auxiliar se conectan al *stand* y se sumergen en una disolución amortiguadora de 0,1 mol L⁻¹ de acético/acetato pH 4,5 que contiene 100 ppm de Bi(III); tras desoxigenar la disolución durante 600 s, se aplica un potencial de deposición de -0,80 V durante 300 s, con agitación de 500 rpm y posteriormente se aplica un tiempo de equilibrio de 20 s sin agitación. Una vez formada la película de bismuto, se lavan cuidadosamente los electrodos con agua milli-Q y la disolución de Bi(III) se reemplaza por la disolución problema.

2. Activación del Bi_{OX}SPCE

Este electrodo se obtiene comercialmente y tiene una capa de óxido de bismuto (III) sobre un sustrato de carbono, por lo que necesita de una etapa de activación antes de ser utilizado. Esta etapa de activación consiste en reducir el óxido de bismuto (III) a bismuto metálico de acuerdo con la siguiente reacción.



Para la activación el electrodo se conecta al potencióstato a través del cable flexible y se coloca una gota (50 µL) de KOH 0,1 mol L⁻¹ sobre el conjunto de

electrodos serigrafiados. La reducción electroquímica tiene lugar al aplicar un potencial de -1,2 V durante 600 s. Una vez activado el electrodo, éste se lava cuidadosamente con agua y se introduce en la celda que contiene la disolución problema. Hay que indicar que en el proceso de activación se utilizan los tres electrodos del dispositivo.

3. *In-situ* BiSPCE

No necesita una preparación previa de la película, ésta se forma por codepositación de Bi(III) con los metales de interés en el momento de la medida voltamperométrica por ASV. Por lo que la modificación *in-situ* de un electrodo SPCE, consiste en adicionar directamente 0,4 ppm de Bi(III) a la celda que contiene la muestra con los metales de interés en una disolución amortiguadora 0,1 mol L⁻¹ de acético/acetato de pH 4,5 en la que se añade KNO₃ 0,1 mol L⁻¹ como electrolito soporte. El electrodo de trabajo SPCE, el de referencia y el auxiliar se introducen en la disolución, y tras su desoxigenación se aplica, en el caso de las determinaciones llevadas a cabo en esta tesis, un potencial de deposición de -1,25 V durante 300 s con agitación a 500 rpm y un tiempo de equilibrio de 30 s. Seguidamente, se registra la curva voltamperométrica al aplicar un barrido de impulsos diferencial con una amplitud de impulso de 0,50 mV y una duración del mismo de 40 ms.

4. Bi_{sp}SPE

Este dispositivo se obtiene comercialmente y no necesita ninguna preparación antes de ser utilizado.

5. *Ex-situ* SbSPCE

El procedimiento es similar al del dispositivo de bismuto y consiste en introducir los tres electrodos, el de trabajo (SPCE), el de referencia y el auxiliar en la celda que contiene la disolución amortiguadora de 0,2 mol L⁻¹ de acético/acetato de pH 4,5 que contiene 50 ppm de Sb(III). Tras desoxigenar la disolución durante 600 s, se aplica un potencial de deposición de -0,5 V durante 180 s, con agitación de 1000 rpm y posteriormente se aplica un tiempo de equilibrio de 20 s sin agitación. Una vez formada la película de antimonio, los electrodos se lavan

con agua milli-Q, y la celda se sustituye por la celda de medida que contiene la muestra con los analitos de interés.

6. *In-situ* SbSPCE

El procedimiento a seguir es similar al descrito para el electrodo *in-situ* BiSPCE; en este caso se adicionan 0,5 ppm de Sb(III) a la celda de medida que contiene la disolución con los metales de interés, la disolución amortiguadora 0,01 mol L⁻¹ de acético/acetato de pH 4,5 y el electrolito soporte KNO₃ 0,01 mol L⁻¹. Los tres electrodos, el de trabajo SPCE, el de referencia y el auxiliar se introducen en la disolución y tras su desoxigenación se aplica, en el caso de las determinaciones llevadas a cabo en esta tesis, dos potenciales de deposición uno de -0,7 V y otro de -1.2 V durante 120 s con agitación a 1000 rpm, un tiempo de equilibrio de 30 s, y finalmente se registra la curva voltamperométrica aplicando un barrido de potencial de impulsos diferencial con impulsos de amplitud 50 mV y 40 ms de duración. Con estos dispositivos se debe realizar una etapa de pretratamiento antes de cada medida aplicando, a un potencial de +0,25 V durante 30 s para eliminar impurezas o especies no deseadas en la superficie.

7. Sb_{Sputtered} SPE

Este dispositivo se obtiene comercialmente y no necesita ninguna preparación antes de ser utilizado.

En esta tesis se realizaron tres estudios con los BiSPEs, en dos de ellos se aplicaron los dispositivos a la determinación de Pb(II) y Cd(II) en un material de referencia que correspondía a aguas subterráneas y en aguas de pozo de El Salvador. En el otro estudio (Trabajo 3, Talanta 107 (2013) 356–360) se utilizó un *ex-situ* BiSPCE y se consideró la complejación de los sistemas Cd-GSH y Cd-PC₂

En los estudios de determinación de Pb(II) y Cd(II) se comenzó poniendo a punto la metodología, optimizando los parámetros analíticos (el potencial de deposición (E_d) y el tiempo de deposición (t_d)) que influyen en la determinación de los metales, así como los medios de medida más adecuados.

Los parámetros y condiciones óptimas utilizadas en el Trabajo 1 (Talanta 119 (2014) 348–352) y el Trabajo 2 (Electroanalysis 2014, 26, 2168 – 2172) se detallan en la Tabla 5 y en la Tabla 6. Se aplica un potencial de deposición durante un tiempo agitando la disolución, seguido de un tiempo de equilibrio de 30 s. Al inicio, se realizan medidas de la disolución que contiene el electrolito soporte y la correspondiente disolución amortiguadora, para fijar el blanco.

A continuación se detalla el procedimiento experimental llevado a cabo para cada uno de los estudios.

Tabla 5. Parámetros y condiciones de medida utilizando electrodos BiSPE.

BiSPEs	Potencial de deposición (V)	Tiempo de deposición (s)	Fuerza iónica (mol L ⁻¹)	Disolución amortiguadora	pH
<i>In-situ</i> BiSPCE	-1,25	300	0,1 KNO ₃	0,1 mol L ⁻¹ de acético/acetato	4,5
Bi _{ox} SPCE	-1,25	45	0,1 KNO ₃	0,1 mol L ⁻¹ de acético/acetato	4,5
<i>Ex-situ</i> BiSPCE	-1,20	120	0,1 KNO ₃	0,01 mol L ⁻¹ de maleico/maleato	6,0
Bi _{sp} SPE	-1,30	360	0,1 KNO ₃	0,01 mol L ⁻¹ de maleico/maleato	6,0

Tabla 6. Parámetros y condiciones de medida utilizados en la determinación de Pb(II) y Cd(II) en aguas de pozos

Electrodo	Potencial de deposición V	Tiempo de deposición s	Fuerza iónica	Disolución amortiguadora	pH
HMDE	-1,2	120	0,01 mol L ⁻¹ KNO ₃	0,01 mol L ⁻¹ de maleico/maleato	6,0
Bi _{sp} SPE	-1,2	360	0,01 mol L ⁻¹ KNO ₃	0,01 mol L ⁻¹ de maleico/maleato	6,0

8.2. Electrodo de bismuto *sputtered* como otra alternativa de modificación de electrodos de bismuto en la determinación de iones cadmio y plomo en aguas subterráneas

En este estudio los electrodos *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE, Bi_{ox}SPE y Bi_{sp}SPE se compararon analítica y microscópicamente como electrodos de trabajo, para la determinación simultánea de Pb(II) y Cd(II) mediante DPASV. A continuación se aplicaron a la determinación de Pb(II) y Cd(II) en una muestra de agua subterránea (material de referencia certificado BCR[®]-610), como ejemplo de su aplicabilidad para el análisis en muestras ambientales de metales pesados a niveles de traza.

Una vez establecida la metodología, se procedió a realizar las curvas de calibración de datos, empleando las condiciones de medida previamente optimizadas (Tabla 5). A partir de las cuales se establecieron los límites de detección (LOD), los límites de cuantificación (LOQ) y los intervalos de linealidad. A continuación, se aplicó la metodología al análisis del material de referencia (agua subterránea) aplicando las mismas condiciones de la Tabla 5. La determinación de los iones Cd²⁺ y Pb²⁺ se llevó a cabo por el método de adición estándar. Se coloca en la celda un volumen conocido de la muestra de agua subterránea y de disolución amortiguadora ajustando el pH al valor correspondiente, se purga con nitrógeno durante 15 minutos para desoxigenar la disolución y se registra la medida, posteriormente se adicionan cinco alícuotas de disolución patrón de Pb(II) y Cd(II) y se construye la correspondiente curva. Se purgó y agitó la disolución durante 1 min después de cada adición de patrón. Para prevenir los cambios de fuerza iónica la disolución de patrones de los metales contenía 0,1 mol L⁻¹ de KNO₃. Las disoluciones patrón de Pb(II) y Cd(II) se preparan a diario a partir de disoluciones patrón más concentradas.

8.3. Estudio de la determinación de los iones Pb(II) y Cd(II) en agua de pozos usando un Bi_{sp}SPE

En este estudio se utilizó el Bi_{sp}SPE como electrodo de trabajo para la determinación simultánea de Pb(II) y Cd(II) mediante DPASV en muestras de agua de pozo recogidas en un área contaminada de El Salvador. Los resultados se compararon con los obtenidos

utilizando un HMDE para ver si el Bi_{sp}SPE podía ser una buena alternativa al electrodo de mercurio.

Una vez establecida la metodología (Tabla 6) se procedió a realizar las curvas de calibrado de datos. La cuantificación de los metales en las aguas de pozos, se realizó por el método de la adición estándar disponiendo en la celda un volumen conocido de la muestra, de la disolución amortiguadora de maleico/maleato y de KNO₃; después de desoxigenar con nitrógeno durante 15 min, se llevan a cabo las medidas utilizando los electrodos Bi_{sp}SPE y el HMDE.

Para la determinación de los metales se adicionaron cinco alícuotas de disolución patrón de Pb(II) y Cd(II) y se procedió a realizar las medidas voltamperométricas. La disolución se purgó con nitrógeno y se agitó mecánicamente durante 1 min después de cada adición.

8.4. Estudio de complejación utilizando un electrodo serigrafiado de carbono modificado con bismuto

Para los estudios de complejación se utilizó el *ex-situ* BiSPCE preparado en las condiciones ya descritas.

Para este estudio se realizaron valoraciones directas e inversas. La valoración directa consiste en adicionar una disolución de ligando, ya sea GSH o PC₂ a una disolución de metal. En la inversa, la valoración se realiza adicionando el metal a una disolución de ligando, ya sea GSH o PC₂.

Sistema cadmio-ligando (valoración directa)

En el caso del GSH se realizaron valoraciones voltamperométricas del Cd(II) con este ligando. El procedimiento consistió en colocar en la celda 20 mL de disolución de Cd(II) de $1,0 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹ en una disolución amortiguadora TRIS /HCl de pH 7,5 que contiene KNO₃ de 0,1 mol L⁻¹. El estudio se llevó a cabo a pH 7,5 y 8,5 y se vio que el pH más apropiado para este estudio era el de 7,5. Mientras que, en el caso de las valoraciones voltamperométricas del Cd(II) con PC₂ el pH más apropiado fue 8,5. Para la primera medida (únicamente el metal) se procedió como en el caso del GSH. Posteriormente, en ambos casos, una vez la muestra es desoxigenada con nitrógeno

durante 20 min se realiza la medida por DPV, se registra y se guarda el voltamperograma resultante. Seguidamente, se comienzan las adiciones de alícuotas de la solución de ligando conteniendo $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ de ligando (GSH o PC_2), después de purgar la disolución durante 1 min, se realizan las medidas por DPV, se registran y se guardan los voltamperogramas después de cada adición. Las valoraciones directas de ambos sistemas Cd(II)-GSH y Cd(II)-PC_2 , se llevaron a cabo hasta un ratio ligando: Cd^{2+} de 3:1 para ambos ligandos.

Sistema ligando-cadmio (valoración inversa)

En el caso de la valoraciones inversas se procedió de una manera similar al caso anterior pero ahora lo que se hace es adicionar metal a una disolución de ligando

Se llevan a cabo las valoraciones voltamperométricas de 20 mL de disolución del ligando $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, ya sea de GSH o PC_2 y se adicionan sucesivamente alícuotas de una disolución de Cd(II) $4 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, y después de cada adición se realizan las medidas por DPV siguiendo el mismo procedimiento que en la valoración directa. Las valoraciones inversas se llevaron a cabo hasta un ratio de Cd(II) : ligando de 2,25:1 para los dos ligandos.

Tabla 7. Tipos de valoraciones voltamperométricas, condiciones de medidas, e intervalos de concentraciones de ligando y metal.

Tipo de valoración	Sistemas	pH	Concentraciones ligando (mol L^{-1})	Concentración Cd(II) (mol L^{-1})
Inversa	$\text{Cd}^{2+}/\text{GSH}$	7,5	$1,0 \times 10^{-5}$	$0 - 2,1 \times 10^{-5}$
Inversa	$\text{Cd}^{2+}/\text{PC}_2$	8,5	$1,0 \times 10^{-5}$	$0 - 2,1 \times 10^{-5}$
Directa	$\text{GSH}/\text{Cd}^{2+}$	7,5	$0 - 2,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$
Directa	$\text{PC}_2/\text{Cd}^{2+}$	8,5	$0 - 2,8 \times 10^{-5}$	$1,0 \times 10^{-5}$

En la Tabla 7 se presentan las valoraciones realizadas para cada sistema, las concentraciones y las condiciones.

Los voltamperogramas obtenidos en las valoraciones voltamperométricas fueron suavizados, se les corrigió la línea base y fueron convertidos a matrices utilizando

Matlab [167]. Los datos fueron tratados por MCR-ALS y GPA. Seleccionándose como el método quimiométrico más apropiado en este estudio el MCR-ALS.

IV

Resultados y discussion

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9. Presentación de resultados de la aplicación de electrodos serigrafiados de bismuto en la determinación de metales pesados en muestras naturales y en estudios de complejación

Las investigaciones llevadas a cabo con electrodos serigrafiados de bismuto (BiSPEs) tanto en los estudios de determinación de metales pesados como el plomo y el cadmio como en los estudios de complejación utilizando técnicas voltamperométricas han permitido la publicación de tres artículos. Estos estudios están lo suficientemente relacionados como para poderlos agrupar en un único capítulo. Su vínculo es la utilización de un electrodo serigrafiado de bismuto.

En el primer artículo (Trabajo 1, Talanta 119 (2014) 348) se ha realizado un estudio comparativo utilizando como electrodos de trabajo diferentes BiSPEs para la determinación de Pb(II) y Cd(II) en un agua subterránea (material de referencia certificado) mediante DPASV. Los BiSPEs utilizados fueron *i) in-situ* BiSPCE; *ii) ex-situ* BiSPCE; *iii) Bi_{OX}SPCE*; y *iv) Bi_{sp}SPE*. Los dos primeros dispositivos fueron obtenidos modificando los SPCE mediante métodos de electrodeposición *in-situ* y *ex-situ* respectivamente. El tercero es un electrodo de bismuto obtenido comercialmente, el cual contiene un precursor metálico (en este caso Bi₂O₃) y el cuarto electrodo preparado mediante la técnica de *sputtering* también se obtuvo comercialmente.

En este estudio se optimizaron, en primer lugar, los parámetros electroquímicos como el potencial de deposición, y el tiempo de deposición, y se seleccionaron los medios más apropiados para la realización de las medidas con cada uno de los electrodos. Seguidamente, se estableció el intervalo de linealidad, así como los límites de detección y cuantificación. Una vez realizados estos estudios se pasó a la cuantificación de los metales en una muestra de agua certificada (BCR[®]-610) mediante el método de calibración de adición estándar, como un ejemplo de la aplicabilidad de estos dispositivos para la determinación de metales pesados a nivel traza en muestras ambientales. Para completar este estudio se realizó la caracterización microscópica de

los diferentes BiSPEs, mediante un microscopio electrónico de barrido efecto campo (FESEM).

En el segundo artículo (Trabajo 2, *Electroanalysis* 26 (2014) 2168) se realizó un estudio comparativo entre el Bi_{sp}SPE y el HMDE en la determinación de Pb(II) y Cd(II) en aguas de pozos procedentes de una zona contaminada con plomo, ubicada en el cantón Sitio del Niño en el departamento de La Libertad en El Salvador. La contaminación con plomo y otros metales pesados en Sitio del Niño, se debe a que en esta zona funcionó durante varios años (aproximadamente entre 1994-2007) una fábrica de baterías de coches. En este artículo se llevó a cabo el estudio de la aplicabilidad del Bi_{sp}SPE en la determinación de metales pesados en muestras de aguas de pozos de esta zona contaminada. Al igual que en el artículo anterior se optimizaron los parámetros electroquímicos, se estableció el intervalo de linealidad, los límites de detección y cuantificación. Posteriormente se procedió a la cuantificación de los metales en tres muestras de aguas de pozos. Para validar los resultados las medidas se realizaron también por ASV con un HMDE.

El tercer artículo (Trabajo 3, *Talanta* 107 (2013) 356) es un estudio de la aplicabilidad del electrodo de bismuto preparado vía *ex-situ* en estudios de complejación de metales con moléculas de interés biológico y medioambiental por DPV, ya que en estudios previos del grupo de investigación se habían considerado los BiFEs como alternativa a los electrodos de mercurio ampliamente estudiados.

Las moléculas consideradas fueron el glutatión (GSH) y la fitoquelatina de dos unidades (PC₂), ambas de interés medioambiental por su capacidad de incorporar metales pesados. Los primeros experimentos de este estudio estuvieron orientados a seleccionar los medios de pH más apropiados para estos sistemas Cd(II)-GSH o Cd(II)-PC₂. Se estudió el sistema Cd(II)-GSH, utilizando una solución amortiguadora de pH 7,5 y 8,5. Se realizaron dos tipos de valoraciones voltamperométricas, la primera en la que se adicionan cantidades crecientes de ligando a una solución de metal (sistema GSH/Cd²⁺, valoración directa) y la segunda donde se adiciona metal a una disolución de ligando (sistema Cd²⁺/GSH, valoración inversa). Los resultados de las valoraciones voltamperométricas ordenados en forma matricial fueron tratados por técnicas quimiométricas como el MCR-ALS y GPA. Posteriormente, experimentos análogos fueron llevados a cabo para el sistema Cd(II)-PC₂.

En los tres trabajos llevados a cabo en este capítulo se pretende valorar las posibilidades de los diferentes electrodos serigrafiados modificados con bismuto, su capacidad para la determinación de metales pesados a nivel traza y la posibilidad de su utilización en estudios de complejación.

9.1. Sputtered bismuth screen-printed electrode: A promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in ground water

Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Talanta 119 (2014) 348–352



Short communication

Sputtered bismuth screen-printed electrode: A promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in groundwater



Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1–11, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 September 2013

Received in revised form

5 November 2013

Accepted 9 November 2013

Available online 14 November 2013

Keywords:

Bismuth screen-printed electrodes

Bismuth sputtered electrodes

Stripping voltammetry

Metal analysis

ABSTRACT

A commercially available sputtered bismuth screen-printed electrode (Bi_{sp}SPE) has been pioneeringly applied for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) ions in a certified groundwater sample by means of differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) as an alternative to more conventional bismuth screen-printed carbon electrodes (BiSPCEs). Bi_{sp}SPEs can be used for a large set of measurements without any previous plating or activation. The obtained detection and quantification limits suggest that Bi_{sp}SPEs produce a better analytical performance as compared to In-situ BiSPCE for Pb(II) and Cd(II) determination, but also to Ex-situ BiSPCE for Cd(II) determination. The results confirm the applicability of these devices for the determination of low level concentrations of these metal ions in natural samples with very high reproducibility (0.7% and 2.5% for Pb(II) and Cd(II) respectively), and good trueness (0.3% and 2.4% for Pb(II) and Cd(II) respectively).

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nowadays a recognized method for the fabrication of sensors and biosensors for the determination of metal ions in industrial, environmental and biomedical applications is based on the screen-printing technology which permits production of numerous highly-reproducible single-use screen-printed electrodes (SPEs) [1]. SPEs usually include working, counter and reference electrodes printed on the same holding. Its accessibility, low cost character, miniaturized size, and the possibility of connection to portable instrumentation make these devices very suitable for on-site determination of target analytes. Many research laboratories possess screen printing machines and they have developed prototype devices from commercial or self-made inks and applied them to a wide variety of application samples [1–3]. Nowadays, different types of SPE can also be commercially purchased from different electrochemical firms (e.g., Dropsens, PalmSens Electrochemical Sensor Interface, Pine Research Instrumentation, eDAQ, Metrohm, Micrux Technologies, etc.).

In the last decade bismuth-based electrodes have become a valuable alternative to mercury electrodes for the analysis of traces of heavy metals in environmental samples [4–6]. Particularly, Bi-coated screen-printed electrodes (BiSPEs) have been gaining advantage over the more conventional Bi-film electrodes (BiFEs) and have been widely used for analytical purposes [7]. The screen-printed

three-electrode configuration is based in most cases on a carbon working electrode, a carbon counter electrode, and a silver/silver chloride reference electrode. Although, these BiSPE can be used as working electrodes in a conventional electrochemical cell with external counter and reference electrodes [8–11]. The method of coating the substrate with bismuth has to be taken into consideration in designing a Bi electrode [6,7]. Three general methods are well-known: (i) Ex-situ plating or preplated method: the SPE is immersed into a Bi(III) solution and, after the application of an appropriate potential, Bi(III) ions are reduced to metallic Bi and electroplated on the electrode surface. Then, the BiSPE is relocated in the sample solution for measurements, (ii) In-situ plating method: Bi(III) ions are directly added to the sample solution and electrochemically deposited on the electrode surface during the analysis, (iii) “Bulk” method: the modification with Bi takes place during the SPE production and lies in the preparation of a mixture between the graphite ink and a determined amount of a bismuth precursor before the printing procedure. Later, the bismuth precursor is electrochemically reduced at a selected potential to metallic Bi [7,12]. An alternative method for the fabrication of a BiSPE is based on the sputtering of the bismuth on a silicon or ceramic substrate leading to a thick Bi film working electrode. This approach simplifies the fabrication process since neither the Bi(III) plating solution nor a conductive substrate is required. Moreover, these sputtered BiSPE are applicable to media covering a wide pH range [13,14].

In the present work, sputtered BiSPEs (Bi_{sp}SPEs) were applied for the first time for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) ions in a certified groundwater sample, as an example of their applicability for the analysis in environmental samples.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.

E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

Moreover, Bi_{sp}SPEs were microscopically and analytically compared with In-situ, Ex-situ and Bi₂O₃-bulk BiSPCEs as working electrodes.

2. Experimental

2.1. Chemicals

A standard Bi(III) 1.000 g L⁻¹ atomic absorption standard solution was purchased from Fluka. Certificated reference material, groundwater (BCR[®]-610) and potassium nitrate trace metals basis were purchased from Sigma Aldrich. All other reagents used were Merck and Fluka analytical grade. Daily standard solutions of Cd(II) and Pb(II) were prepared by appropriate dilution of stock solutions 10⁻² mol L⁻¹, prepared from Cd(NO₃)₂·4H₂O, Pb(NO₃)₂·4H₂O respectively and standardized complexometrically. Maleic acid-KOH buffer and acetic-acetate buffer solutions were used for pH control and KNO₃ 0.1 mol L⁻¹ was employed as supporting electrolyte. Ultrapure water (Milli-Q plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

2.2. Apparatus

Differential pulse anodic stripping voltammetric (DPASV) measurements were performed on Bismuth Screen Printed Carbon Electrodes (BiSPE) in an Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie, The Netherlands) attached to a Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Switzerland) and a personal computer with GPES version 4.9 data acquisition software (EcoChemie).

The reference electrode (to which all potentials are referred) and the auxiliary electrode were Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹) and Pt wire, respectively.

The working electrode was in all cases a BiSPE. Ex-situ and In-situ BiSPCE were prepared from a commercial screen-printed carbon disk electrode of 4 mm diameter (ref. 110, DS SPCE) provided by DropSens (Spain). Bi₂O₃ bulk BiSPCE (Bi_{ox}SPCE) was obtained from the activation of a commercial bismuth oxide screen-printed carbon disk electrode of 4 mm diameter (ref. 110Bi, DS SPCE) provided by DropSens (Spain), and the Bi_{sp}SPE was a sputtered thick film bismuth of 4 mm of diameter (ref. Bi10, DS SPE) provided by DropSens (Spain).

All screen-printed electrodes were connected to the Autolab by means of a flexible cable (ref. CAC, DropSens).

All measurements were carried out in a glass cell at room temperature (20 °C) under a purified nitrogen atmosphere (Linde N50).

For In-situ BiSPCE and Bi_{ox}SPCE a deposition potential (E_d) of -1.25 V was applied with stirring during a deposition time (t_d) of 300 s and 45 s respectively; a E_d of -1.20 V during 120 s with stirring was applied for Ex-situ BiSPCE; and a E_d of -1.30 V during 360 s was applied for Bi_{sp}SPE also with stirring of the solution. A rest period (t_r) of 30 s for all electrodes was maintained between deposition and stripping step. Unless otherwise indicated, a pulse time of 40 ms, step potential of 2 mV, and pulse amplitude of 50 mV were applied in the stripping step.

2.3. Experimental procedure

2.3.1. In-situ preparation of BiSPCE

For the bismuth In-situ modification of SPCE, 0.4 ppm Bi(III) ions are directly added to the sample solution and electrochemically deposited with the target metal ion (lead and cadmium) on the electrode surface during the analysis.

2.3.2. Ex-situ preparation of BiSPCE

The SPCE, the reference, and the auxiliary electrodes were connected to the stand and immersed into 20 mL of a 0.2 mol L⁻¹ acetate buffer solution (pH 4.5) containing 100 ppm Bi(III). After deaeration of the solution for 10 min, $E_d = -0.80$ V was applied for 300 s with solution stirring, followed by a rest period (without stirring) of 20 s. Once the bismuth film was deposited, all electrodes were rinsed carefully with water and the Bi(III) solution was replaced in the cell by the one to be measured. This methodology was previously tested showing a very high repetitivity and reproducibility [11].

2.3.3. Activation of the Bi_{ox}SPCE

Prior to be used the bismuth (III) oxide of the commercial screen-printed electrode has to be reduced to metallic bismuth following the reaction:



Therefore, the commercial device is connected to the Autolab by means of the flexible cable, and a drop of KOH 0.1 mol L⁻¹ (50 μ L) is put over the electrodic surface. The electrochemical reduction takes place by applying a potential of -1.2 V for 600 s.

2.3.4. Procedure

Before each set of measurements, the whole electrochemical cell including KNO₃ supporting electrolyte and maleic/maleate or acetic/acetate buffer solution was analyzed for traces of metals using DPASV on the corresponding BiSPE.

The linear calibration plots for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) on different BiSPE were obtained from DPASV measurements at pH 4.5 acetic/acetate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for In-situ BiSPCE and Bi_{ox}SPCE, and at pH 6.0 maleic/maleate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for Ex-situ BiSPCE and Bi_{sp}SPE, increasing concentrations of Pb(II) and Cd(II).

In the analysis of the certified groundwater sample, voltammetric analysis started by placing in the cell a volume of the groundwater sample (BCR610) and 0.1 mol L⁻¹ acetic/acetate buffer (pH 4.5) for In-situ BiSPCE and Bi_{ox}SPCE, and 0.01 mol L⁻¹ maleic/maleate buffer (pH 6.0) for Ex-situ BiSPCE and Bi_{sp}SPE. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 15 min to avoid the effect of oxygen in voltammetric measurements, and the groundwater sample scan was recorded. In the case of calibration by standard addition, five aliquots of Pb(II) and Cd(II) standard solution were further added and the respective curves were recorded. All solutions were deaerated and mechanically stirred for 1 min after each standard addition. In order to prevent changes in ionic strength and pH, the solutions to be added contained 0.1 mol L⁻¹ KNO₃.

3. Results and discussion

3.1. Morphological surface characterization: SEM analysis

The surface morphology characterization was carried out by a Scanning Electron Microscope JSM 7100FE from JEOL (Japan). Fig. 1 compares the SEM images obtained at 10,000 $\times$ magnifications of a bare SPCE and the different BiSPEs. The scanning electron micrograph of a typical bare (commercial) SPCE (Fig. 1a) exhibits a uniform carbon surface in comparison with the BiSPE surfaces (Fig. 1b–f). Fig. 1b and c corresponds to SEM images of In-situ BiSPCE and Ex-situ BiSPCE respectively, in which the deposited Bi can be observed (especially in Ex-situ BiSPCE approach). Nevertheless, in both In-situ BiSPCE and Ex-situ BiSPCE the Bi-film formed by firmly fixed Bi does not cover the entire carbon surface.

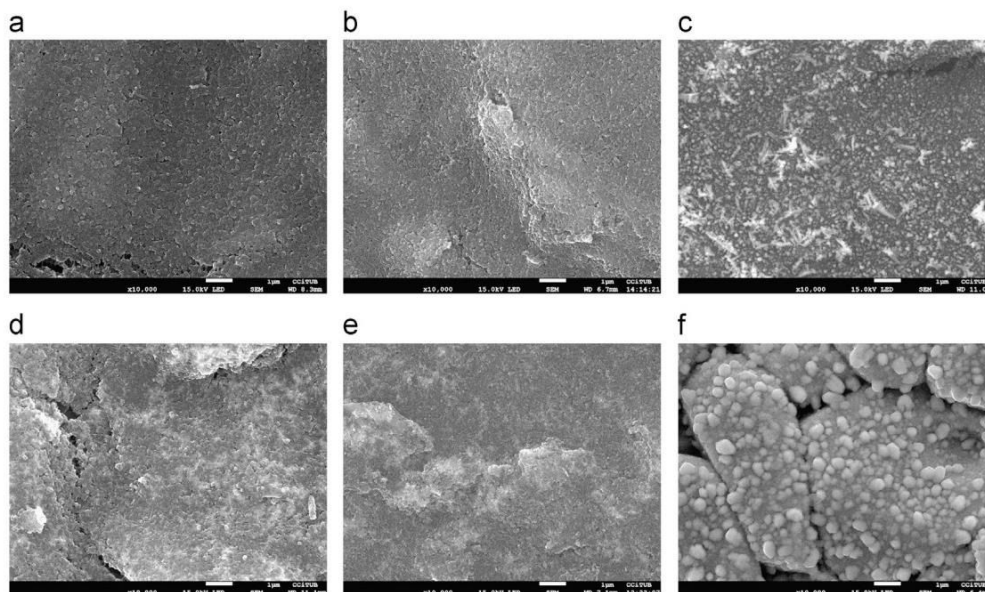


Fig. 1. Scanning electron micrographs: (a) commercial screen-printed carbon electrode (SPCE); (b) bismuth film coated In-situ on a commercial SPCE; (c) bismuth film coated Ex-situ on a commercial SPCE; (d) commercial bismuth oxide screen-printed carbon electrode before and (e) after electrochemical reduction at -1.2 V for 600 s in a 0.1 mol L^{-1} KOH solution; and (f) commercial bismuth sputtered screen-printed electrode. Resolution of $1 \mu\text{m}$, magnification of $10,000\times$ and accelerating potential of 15.0 kV were used.

Surface morphologies of Bi_{Ox} SPCE before and after the electrochemical reduction of the precursor are illustrated in Fig. 1d and e respectively. Before the electrochemical reduction Bi_2O_3 particles were uniformly distributed throughout the electrode surface, and were successfully changed to Bi after electrochemical reduction following reaction (1), resulting in a reasonably uniform Bi film slightly different to that observed for In-situ BiSPCE and Ex-situ BiSPCE. The surface morphology of Bi_{sp} SPE was the most different from the rest of BiSPE as it can be seen in its scanning electron micrograph (Fig. 1f). The main differences are that the substrate of this electrode is ceramic instead of carbon and that Bi was sputtered directly on it, showing a rough surface with a granular structure due to the Bi deposited on the electrode surface.

The comparison of the scanning electron micrographs makes evident the different surface morphologies of the different BiSPEs, which could certainly affect their electroanalytical performance.

3.2. Calibration data

Calibration data for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) ions on In-situ BiSPCE, Ex-situ BiSPCE, Bi_{Ox} SPCE, and Bi_{sp} SPE by stripping voltammetry (DPASV) are summarized in Table 1. The lowest value of the linear concentration range was established from the corresponding limit of quantification (LOQ). The LOQ was calculated as 10 times the standard deviation of the intercept over the slope of the calibration curve of the target ions. LOD was evaluated by considering three times the previous relation. For LOD and LOQ determinations, ten standard concentrations of Cd(II) and Pb(II) were used as calibration samples. Well defined peaks for Pb(II) and Cd(II) were obtained for In-situ BiSPCE, Ex-situ BiSPCE, and Bi_{sp} SPE approaches, whereas for Bi_{Ox} SPCE approach a stripping peak for Pb(II) and Cd(II) was observed at low concentrations, but after increasing the Pb(II) and Cd(II) concentrations the Cd(II) signal splits in two overlapping peaks. This Cd(II) behavior was previously observed with a conventional Ex-situ Bi film electrode (BiFE) [15]. A possible explanation of this behavior could be related with the accumulation

step in which two different association mechanisms could be implied, one with the formed bismuth and another with the base electrode surface. In agreement with this preceding work [15], the total area of the voltammograms can be considered. Then an excellent linear response of the peak area versus both Cd(II) and Pb(II) concentrations is obtained for all BiSPE types. As shown in Table 1, the obtained LOQ are in all cases around or slightly lower than the LOQ reported for Ex-situ BiSPCE, In-situ BiSPCE, and Bi_{Ox} SPCE in a recent review [7]. For Bi_{sp} SPE no previous LOQ data for Cd(II) and Pb(II) are available in the literature. Regarding LOD values, the BiSPE obtained using the In-situ approach was the one with the highest LOD for both Cd(II) and Pb(II) determination; while the lowest LODs were provided by Bi_{Ox} SPCE and Bi_{sp} SPE for Cd(II), and Ex-situ BiSPCE for Pb(II), although it was not significantly different from that obtained with Bi_{Ox} SPCE and Bi_{sp} SPE. In comparison with previous studies (and Tables 1 and 2 in [7]), the Cd(II) and Pb(II) LODs obtained in this work for In-situ and Ex-situ approaches are relatively lower than those previously reported [10,16–25]. Regarding Bi_{Ox} SPCE, the LOD values are significantly lower than those shown in literature (Table 3 in [7]) for both Cd(II) [12,20,26,27] and Pb(II) [12,19,20,26,27]. Despite there are no studies reported in the literature about the use of Bi_{sp} SPE for Cd(II) and Pb(II) determination, the obtained calibration data suggest that Bi_{sp} SPE could be a good alternative for the determination of trace level concentrations of Pb(II) and Cd(II) in natural samples, with the additional advantage that is commercially available and does not need any previous treatment.

3.3. Application to the analysis of groundwater samples

A groundwater certified reference material (BCR-610) was selected to study the applicability of Bi_{sp} SPE for the determination of Cd(II) and Pb(II), and to compare its analytical performance with In-situ, Ex-situ and Bi_{Ox} SPCE. Pb(II) and Cd(II) ions were determined by means of the standard addition method. Then, voltammetric stripping measurements following the aforementioned conditions were carried out including the additions of Pb(II) and

Table 1

Calibration data for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) on different bismuth screen-printed electrodes at pH 4.5 and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for In-situ BiSPCE and Bi_{OX}SPCE, and at pH 6.0 and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for Ex-situ BiSPCE and Bi_{SP}SPE.

Electrode	Pb(II)				Cd(II)			
	Regression	R ²	Linear range (μg L ⁻¹) ^a	LOD (μg L ⁻¹)	Regression	R ²	Linear range (μg L ⁻¹) ^a	LOD (μg L ⁻¹)
In-situ BiSPCE	$y = 7.17x + 11.27$	0.9998	0.83–23.3	0.25	$y = 6.62x + 2.14$	0.9991	1.35–14.5	0.40
Ex-situ BiSPCE	$y = 3.53x + 4.33$	0.9999	0.48–19.6	0.14	$y = 2.78x - 3.30$	0.9998	0.80–17.2	0.24
Bi _{OX} SPCE	$y = 5.41x + 29.59$	0.9998	0.52–12.0	0.16	$y = 31.52x - 7.12$	0.9999	0.33–9.0	0.10
Bi _{SP} SPE	$y = 3.03x + 0.47$	0.9998	0.53–19.8	0.16	$y = 0.78x + 0.18$	0.9999	0.33–12.3	0.10

^a The lowest value of the linear range was considered from the LOQ.

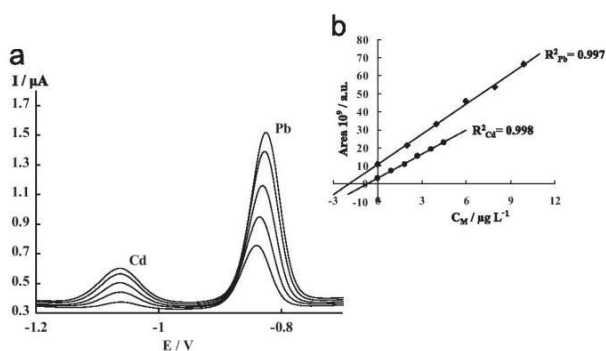


Fig. 2. (a) DPASV measurements in groundwater samples on In-situ BiSPCE at pH 4.5 acetic/acetate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.25 V during a t_d of 300 s and t_r of 30 s; and (b) standard addition plot for the determination of Cd(II) and Pb(II).

Cd(II). It should be considered that for In-situ SPCE, Ex-situ SPCE and Bi_{SP}SPE approaches, the same BiSPE device was used for the DPASV measurements of a complete replicate, whereas for Bi_{OX}SPCE a new device was required for each DPASV measurement. Figs. 2a, 3a, 4a and 5a, show representative DP voltammograms obtained in the analysis of the groundwater samples using In-situ BiSPCE, Ex-situ BiSPCE, Bi_{OX}SPCE, and Bi_{SP}SPE, respectively. The selected deposition potential and deposition time were optimized for each BiSPE (data not shown), being for In-situ BiSPCE -1.25 V and 300 s, Ex-situ BiSPCE -1.20 V and 120 s, Bi_{OX}SPCE -1.25 V and 45 s and Bi_{SP}SPE -1.30 V and 360 s. Pb(II) and Cd(II) peaks behave in the same way as in the case of the calibration data: well defined peaks for Pb(II) and Cd(II) were observed for In-situ BiSPCE, Ex-situ BiSPCE, and Bi_{SP}SPE approaches, whereas for Bi_{OX}SPCE approach a stripping peak for Pb(II) and Cd(II) was observed in the groundwater sample, but after Pb(II) and Cd(II) standard additions the Cd(II) signal splits again in two overlapping peaks. Therefore, the total area of the voltammograms were once again considered [15], being linear with Pb(II) and Cd(II) concentrations. The standard addition plots and the good correlation coefficients resulting from the representative DPASV measurements carried out using In-situ BiSPCE, Ex-situ BiSPCE, Bi_{OX}SPCE, and Bi_{SP}SPE are shown in Figs. 2b, 3b, 4b and 5b, respectively. The Cd(II) and Pb(II) concentration data obtained from the DPASV determination of three replicates of the certified groundwater sample performed using the different BiSPEs are reported in Table 2. A good concordance between each metal concentration obtained from the different BiSPEs approaches, as well as with the certified Cd(II) and Pb(II) value in groundwater, was observed. The relative standard deviation (RSD%) was at most 4.6% for Cd(II) determination using an In-situ BiSPE, and 3.5% for Pb(II) determination using an Ex-situ BiSPE. The RSD obtained using Bi_{OX}SPCE and Bi_{SP}SPE for Cd(II) and Pb(II) determination was not higher than 2.5%. Regarding the relative error, the Bi_{OX}SPCE approach was the

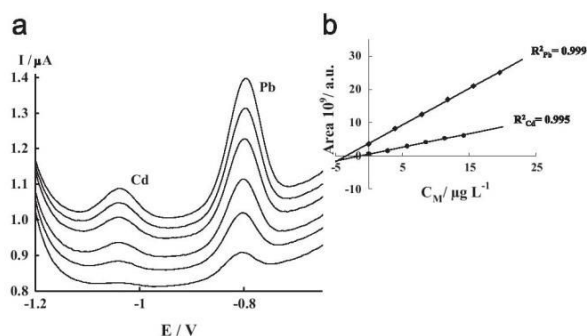


Fig. 3. (a) DPASV measurements in groundwater samples on Ex-situ BiSPCE at pH 6.0 maleic/maleate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.20 V during a t_d of 120 s and t_r of 30 s; and (b) standard addition plot for the determination of Cd(II) and Pb(II).

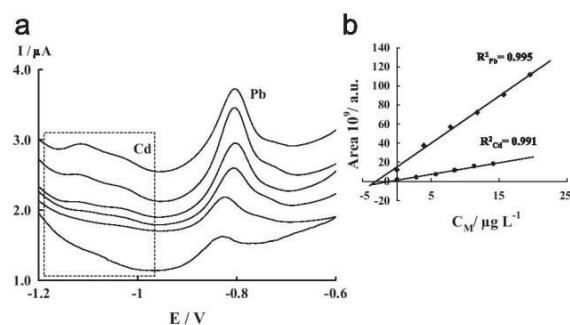


Fig. 4. (a) DPASV measurements in groundwater samples on Bi_{OX}SPCE at pH 4.5 acetic/acetate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.25 V during a t_d of 45 s and t_r of 30 s; and (b) standard addition plot for the determination of Cd(II) and Pb(II).

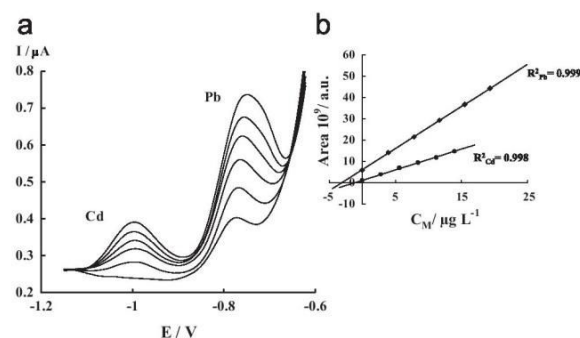


Fig. 5. (a) DPASV measurements in groundwater samples on Bi_{SP}SPE at pH 6.0 maleic/maleate buffer and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.30 V during a t_d of 360 s and t_r of 30 s; and (b) standard addition plot for the determination of Cd(II) and Pb(II).

Table 2

Total concentrations of Pb(II) and Cd(II) determined in certified groundwater (BCR610) by DPASV on different bismuth screen-printed electrodes by standard addition calibration method at pH 4.5 and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for In-situ BiSPCE and Bi_{ox}SPCE, and at pH 6.0 and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength for Ex-situ BiSPCE and Bi_{sp}SPE.

Electrode	Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Relative error (%)	Cadmium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Relative error (%)
In-situ BiSPCE	7.76	0.8	0.3	2.89	4.6	1.7
Ex-situ BiSPCE	7.95	3.5	2.2	2.99	2.9	1.7
Bi _{ox} SPCE	7.65	1.4	1.7	2.66	0.8	9.5
Bi _{sp} SPE	7.80	0.7	0.3	3.01	2.5	2.4
Certified value	7.78	1.7	–	2.94	2.7	–

$n=3$ for RSD (%).

one with the highest value (9.5%) for Cd(II) determination; while for Pb(II) determination was at most 2.2% using an Ex-situ BiSPE. These good results confirm the applicability of the more conventional BiSPCEs obtained from In-situ and Ex-situ plating, and “bulk” methods for the determination of low level concentrations of Cd(II) and Pb(II). In addition, it is demonstrated that BiSPE obtained from Bi sputtered method can be also an interesting and valuable alternative for the determination of these metal ions in natural samples.

4. Conclusions

In this study, analytical and microscopic features of different commercial BiSPCEs approaches were compared. At the view of the results, it can be concluded that Bi_{sp}SPE constitutes a good improvement for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) ions at low $\mu\text{g L}^{-1}$ level. As in the case of the more conventional BiSPCEs, the low toxicity, the disposable character, the good reproducibility, the homogeneous surface morphology and the low-cost commercial availability of the Bi_{sp}SPEs make them attractive for environmental applications. In addition, Bi_{sp}SPE could be an alternative to BiSPCE if the presence of Bi(III) ion can affect the metal speciation in the sample. In comparison with more conventional BiSPCEs, the Bi_{sp}SPEs are somewhat more expensive, but in contrast can be used as they are commercially acquired without any previous treatment before measurements. Moreover, the disposable device can be used for a large set of measurements without signs of degradation or loss of sensitivity. Related to their analytical performances, Bi_{sp}SPEs produce normal-shaped stripping signals for both Cd(II) and Pb(II) ions. The provided LOD and LOQ were at levels of $\mu\text{g L}^{-1}$ and slightly lower than the ones obtained using In-situ BiSPCE for Pb(II) and Cd(II) determination, and Ex-situ BiSPCE for Cd(II) determination.

Furthermore, the above reported results show that Bi_{sp}SPE can be successfully applied for the determination of Pb(II) and Cd(II) in a natural sample with very high reproducibility and good trueness inferred by the relative standard deviation (0.7% for Pb(II) and 2.5% for Cd(II)) and the relative error (0.3% for Pb(II) and 2.4% for Cd(II)), respectively.

Acknowledgment

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Projects CTQ2009-09471 and CTQ2012-32863). Velia Sosa is grateful to Fundación Carolina for her Ph.D. grant.

References

- [1] J.P. Hart, S.A. Wring, Trends Anal. Chem. 16 (1997) 89–103.
- [2] O. Domínguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, Talanta 73 (2007) 202–219.
- [3] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton, Anal. Lett. 37 (2004) 789–830.
- [4] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, B. Ogorevc, Anal. Chem. 72 (2000) 3218–3222.
- [5] J. Wang, Electroanalysis 17 (2005) 1341–1346.
- [6] A. Economou, Trends Anal. Chem. 24 (2005) 334–340.
- [7] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Trends Anal. Chem. 46 (2013) 15–29.
- [8] K.C. Honeychurch, D.M. Hawkins, J.P. Hart, D.C. Cowell, Talanta 57 (2002) 565–574.
- [9] R.O. Kadara, J.D. Newman, I.E. Tothill, Anal. Chim. Acta 493 (2003) 95–104.
- [10] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2010) 1365–1369.
- [11] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Electroanalysis 22 (2010) 1460–1467.
- [12] R.O. Kadara, N. Jenkinson, C.E. Banks, Electroanalysis 21 (2009) 2410–2414.
- [13] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, T. Spiliotis, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 111–118.
- [14] C. Kokkinos, A. Economou, M. Koupparis, Talanta 77 (2009) 1137–1142.
- [15] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Electrochim. Acta 53 (2008) 6616–6622.
- [16] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, Electroanalysis 13 (2001) 13–16.
- [17] A. Zaouak, L. Authier, C. Cugnet, A. Castetbon, M. Potin-Gautier, Electroanalysis 21 (2009) 689–695.
- [18] A. Mandil, A. Amine, Anal. Lett. 42 (2009) 1245–1257.
- [19] J.C. Quintana, F. Arduini, A. Amine, F. Punzo, G.L. Destri, C. Bianchini, D. Zane, A. Curulli, G. Palleschi, D. Moscone, Anal. Chim. Acta 707 (2011) 171–177.
- [20] N. Lezi, A. Economou, P.A. Dimovasilis, P.N. Trikalitis, M.I. Prodromidis, Anal. Chim. Acta 728 (2012) 1–8.
- [21] M.A. Granado Rico, M. Olivares-Marín, E. Pinilla Gil, Electroanalysis 20 (2008) 2608–2613.
- [22] H.-L. Fang, H.-X. Zheng, M.-Y. Ou, Q. Meng, D.-H. Fan, W. Wang, Sens. Actuators B 153 (2011) 369–372.
- [23] S.N. Tan, L. Ge, W. Wang, Anal. Chem. 82 (2010) 8844–8847.
- [24] M. Li, D.-W. Li, Y.-T. Li, D.-K. Xu, Y.-T. Long, Anal. Chim. Acta 701 (2011) 157–163.
- [25] C. Henríquez, L.M. Laglera, M.J. Alpizar, J. Calvo, F. Arduini, V. Cerdà, Talanta 96 (2012) 140–146.
- [26] G.-H. Hwang, W.-K. Han, J.-S. Park, S.-G. Kang, Sens. Actuators B 135 (2008) 309–316.
- [27] R.O. Kadara, I.E. Tothill, Anal. Chim. Acta 623 (2008) 76–81.

9.2. Voltammetric determination of Pb(II) and Cd(II) ions in well water using a sputtered bismuth screen-printed electrode

Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Electroanalysis 2014, 26, 2168 – 2172

Voltammetric Determination of Pb(II) and Cd(II) Ions in Well Water Using a Sputtered Bismuth Screen-Printed Electrode

Velia Sosa,^[a] Núria Serrano,^[a] Cristina Ariño,^{*,[a]} José Manuel Díaz-Cruz,^[a] and Miquel Esteban^[a]

Abstract: A method using commercially available sputtered bismuth screen-printed electrodes ($\text{Bi}_{\text{sp}}\text{SPE}$), as substitute to mercury electrodes, for the determination of trace Pb(II) and Cd(II) ions in drinking well water samples collected in a contaminated area in The Republic of El Salvador by means of differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) has been proposed. The

comparable detection and quantification limits obtained for both $\text{Bi}_{\text{sp}}\text{SPE}$ and hanging mercury drop electrode (HMDE), together with the similar results with a high reproducibility obtained in these water samples analyses recommend the applicability of $\text{Bi}_{\text{sp}}\text{SPE}$ for the determination of low level of metal concentrations in natural samples.

Keywords: Bismuth sputtered electrodes • Screen-printed electrodes • Stripping voltammetry • Metal ions

1 Introduction

Heavy metals are metals and metal compounds that have been associated with contamination and potential toxicity or ecotoxicity [1]. They negatively affect people's health when absorbed or inhaled. In very small amounts, some heavy metals (e.g. Co, Cr, Cu, Mo, Mn, Ni and Zn) are necessary to support life, but in large amounts, they can become toxic [2–4]. This is not the case of non essential trace metals (mainly Cd, Pb and Hg), which do not have any known biological function, and whose presence in excessive amounts provokes dysfunctions in the living beings. Common sources of heavy metals are from mining and industrial wastes, lead-acid batteries, vehicle emissions, fertilizers, paints and treated woods, being Pb the most prevalent heavy metal contaminant. Heavy metals may enter the body in food, water, air, or by absorption through the skin. Once in the body, they compete with and displace essential minerals such as Zn, Cu, Mg and Ca, and interfere with organ system function. Heavy metals are especially dangerous because they tend to bioaccumulate, it means that they become toxic when they are not metabolized by the body and accumulate in the soft tissues [5].

Stripping techniques are particularly suitable for the determination of trace metals in samples of environmental and biological origin [6], due to their excellent detection limits, their sensitivity to the presence of different metal species, their capacity to multielement determination and their simple but complete instrumentation and scarcely maintenance. For many years, the electroanalytical techniques were linked with the use of mercury electrodes as working electrode for the determination of trace metal ions in environmental samples due to their wide cathodic range [7]. Nevertheless, the high toxicity of the soluble salts of mercury as well as the emergence of

bismuth-based electrodes as a valuable alternative to mercury electrodes for the analysis of traces of heavy metals in environmental samples makes mercury electrodes progressively fell into disuse [8–10]. Furthermore, at the present time, the screen-printing technology is a recognized method for the fabrication of sensors and biosensors for the determination of metal ions in several applications [11]. SPEs usually include a three electrode configuration (working, counter and reference electrodes) printed on the same strip. Although, they can be used as working electrodes in a conventional electrochemical cell with external counter and reference electrodes [12–16]. In addition, screen-printed devices are known for their accessible, low-cost character, miniaturized size, and the possibility of connecting them to portable instrumentation. Therefore, combining both the lower toxicity of the bismuth and the screen printing technology Bi-coated screen-printed electrodes (BiSPEs) have been widely used for analytical purposes [17].

Three general methods of coating the substrate with bismuth are well-known [10,17]: i) *ex situ* plating or pre-plated method, ii) *in situ* plating method, and iii) “bulk” method or electrochemical reduction of a bismuth precursor to metallic Bi. Recently, an alternative method for the fabrication of a BiSPE is based on the sputtering of the bismuth on a silicon or ceramic substrate leading to a thick Bi film working electrode. Thus, the fabrication process is simplified since neither the Bi(III) plating solution nor a conductive substrate is required. Moreover,

[a] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban
Departament de Química Analítica, Facultat de Química,
Universitat de Barcelona
Martí i Franquès 1-11, E-08028 – Barcelona, Spain
phone: (34) 93 402 15 45, fax: (34) 93 402 12 33
*e-mail: cristina.arino@ub.edu

Full Paper

ELECTROANALYSIS

these sputtered BiSPE can be also used for the determination of metal ions at low $\mu\text{g L}^{-1}$ level behaving in a similar way to the more conventional BiSPE approaches and covering a wide pH range [18–20].

In the present study, Bi_{sp}SPE was applied for the determination of trace metal ions in real drinking well water samples collected in a contaminated area in The Republic of El Salvador. Furthermore, Bi_{sp}SPE was analytically compared with HMDE in order to see if Bi_{sp}SPE can be implemented as a good replacement to mercury electrodes.

2 Experimental

2.1 Chemicals

A standard Bi(III) 1.000 g L⁻¹ atomic absorption standard solution was purchased from Fluka. Potassium nitrate trace metals basis was purchased from Sigma Aldrich. All other reagents used were Merck and Fluka analytical grade. Daily standard solutions of Cd(II) and Pb(II) were prepared by appropriate dilution of stock solutions 10⁻² mol L⁻¹, prepared from Cd(NO₃)₂·4H₂O and Pb(NO₃)₂·4H₂O, respectively, and standardized complexometrically. Maleic acid/maleate buffer solution was used for pH control and KNO₃ 0.01 mol L⁻¹ was employed as supporting electrolyte. Ultrapure water (Milli-Q plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

2.2 Well Water Samples

Drinking water samples collected from three different wells (N 13° 47' 28.6" W 089° 22' 9.5", N 13° 47' 29.0" W 089° 22' 1.4" and, N 13° 47' 30.4" W 089° 21' 58.3") of an area affected by lead contamination from a battery factory in Sitio del Niño (La Libertad, Republic of El Salvador), where in 2010 the Minister of Environment and Natural Resources of El Salvador (MARN) decreed a "state of environmental emergency", were analyzed. Once the samples were collected, pH and conductivity measurements were carried out and the obtained values are summarized in Table 2 (Section 3.2). Finally, samples were acidified and kept refrigerated at 4 °C for their conservation.

2.3 Apparatus

Differential pulse anodic stripping voltammetric (DPASV) measurements were performed in an Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie, The Netherlands) attached to a Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Switzerland) and a personal computer with GPES version 4.9 data acquisition software (EcoChemie).

The reference electrode (to which all potentials are referred) and the auxiliary electrode were Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹) and Pt wire, respectively.

In some experiments, the working electrode used was a sputtered thick film bismuth screen-printed electrode

(Bi_{sp}SPE) of 4 mm of diameter (ref. Bi10, DS SPE) provided by DropSens (Spain). These electrodes are used as purchased since any previous treatment is required. In other cases, a multimode electrode Metrohm producing drops of ca. 0.5 mm² surface that could work as an HMDE (Hanging Mercury Drop Electrode) was used.

Screen-printed electrodes were connected to the Autolab by means of a flexible cable (ref. CAC, DropSens).

A Crison micro pH 2000 pH-meter and a conductimeter Orion 120 connected to a conductimetric cell 99-01-01 (cell constant 1.03 cm⁻¹) were used for pH and conductivity measurements respectively.

All measurements were carried out in a glass cell at room temperature (20 °C) under a purified nitrogen atmosphere (Linde N50).

Unless otherwise indicated, a pulse time of 40 ms, step potential of 2 mV, and pulse amplitude of 50 mV were applied in the stripping step. For Bi_{sp}SPE and HMDE a deposition potential (E_d) of -1.20 V was applied with stirring during a deposition time (t_d) of 360 s and 120 s respectively, and a rest period (t_r) of 30 s for both electrodes was maintained between deposition and stripping step.

2.4 Experimental Procedure

Before each set of measurements, the whole electrochemical cell including KNO₃ supporting electrolyte and maleic/maleate buffer solution was analyzed for traces of metals using DPASV on the corresponding electrode.

The linear calibration plots for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) on Bi_{sp}SPE and HMDE were obtained from DPASV measurements at pH 6.0 in the presence of maleic/maleate buffer and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength, at increasing concentrations of Pb(II) and Cd(II).

In the analysis of the drinking well water samples, voltammetric analysis started by placing in the cell a volume of the well water sample and 0.01 mol L⁻¹ maleic/maleate buffer (pH 6.0) for Bi_{sp}SPE and HMDE. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 15 min to avoid the effect of oxygen in voltammetric measurements, and the well water sample scan was recorded. In the case of calibration by standard addition, five aliquots of Pb(II) and Cd(II) standard solution were further added and the respective curves were recorded. All solutions were deaerated and mechanically stirred for 1 min after each standard addition. In order to prevent changes in ionic strength and pH, the solutions to be added contained 0.01 mol L⁻¹ KNO₃.

3 Results and Discussion

3.1 Calibration Data

Simultaneous calibration of Pb(II) and Cd(II) ions by stripping voltammetry (DPASV) was carried out on Bi_{sp}SPE and HMDE and the results are summarized in Table 1. The LOD was calculated as 3 times the standard

Full Paper

ELECTROANALYSIS

Table 1. Calibration data for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) on Bi_{sp}SPE and HMDE at pH 6.0 and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength.

Electrode	Pb(II)				Cd(II)			
	Regression	<i>R</i> ²	Linear range (μg L ⁻¹)[a]	<i>LOD</i> (μg L ⁻¹)	Regression	<i>R</i> ²	Linear range (μg L ⁻¹)[a]	<i>LOD</i> (μg L ⁻¹)
Bi _{sp} SPE	$y = 3.03x + 0.49$	0.9997	0.59–16.9	0.18	$y = 0.78x + 0.17$	0.9998	0.35–10.6	0.10
HMDE	$y = 1.45x + 1.58$	0.9997	0.50–16.9	0.15	$y = 2.77x - 0.06$	0.9998	0.29–10.6	0.09

[a] The lowest value of the linear range was considered from the *LOQ*.

deviation of the intercept over the slope of the calibration curve of the target ions. *LOQ* was evaluated by considering 10 times the previous ratio. The lowest value of the linear concentration range was established from the corresponding limit of quantification (*LOQ*). For *LOD* and *LOQ* determinations, ten standard concentrations of Pb(II) and Cd(II) were used as calibration samples. Well defined peaks without signal splitting [21] were observed for Pb(II) and Cd(II) in all the concentration range for both Bi_{sp}SPE and HMDE. Excellent linear responses of the peak area versus concentration were also obtained for Pb(II) and Cd(II) until a concentration level of 16.9 and 10.6 μg L⁻¹ respectively. For both Pb(II) and Cd(II), the computed *LODs* and *LOQs* for Bi_{sp}SPE were not significantly different from those obtained with HMDE (Table 1). In comparison with a recent work [18] the *LODs* provided by Bi_{sp}SPE were slightly lower than the *LODs* obtained using Ex-situ and In-situ approaches for Cd(II) and, on the order of those reported for Ex-situ BiSPCE, In-situ BiSPCE, and Bi_{ox}SPCE for Pb(II). It is remarkable that the *LOQ* values obtained using Bi_{sp}SPE are in all cases around or slightly lower than the *LOQs* reported in the literature [7,18] for other BiSPE approaches.

In agreement with the good voltammetric performance of the Bi_{sp}SPE in comparison with classical HMDE and more widespread BiSPE approaches, Bi_{sp}SPE could be a promising implement for the determination of heavy metals in real samples as an environmentally friendly alternative to mercury electrodes, with the plus that it is commercially available and, unlike the Ex-situ, In-situ and bulk approaches does not need any previous treatment.

3.2 Application to Drinking Well Water Samples

Three drinking well water samples collected from a contaminated area in the Republic of El Salvador were assayed to test the applicability of Bi_{sp}SPE as a replacement of HMDE for the determination of Cd(II) and Pb(II) in real samples. Three replicates of each well water sample were analyzed after pH adjustment with maleic/maleate buffer. Thus, voltammetric stripping measurements following the aforementioned conditions using both Bi_{sp}SPE and HMDE were carried out including the additions of Pb(II) and Cd(II). It should be emphasized that for Bi_{sp}SPE ap-

proach an unique screen-printed device was used for a complete replicate of DPASV measurements.

It was only possible to quantify Pb(II) in the samples by means of the standard addition method, since Cd(II) did not show any noticeable signal in any of the three well water samples analyzed.

Figures 1a and 2a show, respectively, representative voltammograms using Bi_{sp}SPE and HMDE obtained in the analysis of the drinking well samples, namely Sample C.

Using both a Bi_{sp}SPE as an HMDE a normal-shaped stripping signal for Pb(II) was observed in the three collected well water samples, but no signal due to Cd(II) ion was detected in any of them. The standard addition plots for Pb(II) and the good correlation coefficients resulting from the representative DPASV measurements carried out using both Bi_{sp}SPE and HMDE are shown in Figures 1b and 2b, respectively.

The concentration data obtained from the voltammetric determination of each of the three well water samples carried out using a Bi_{sp}SPE and an HMDE are summarized in Table 2. In order to evaluate the agreement between Pb(II) concentration obtained from Bi_{sp}SPE and HMDE voltammetric measurements a two-tailed t-test (equal variances) was carried out for each sample, concluding that for a confidence level of 95 % the results obtained using both electrodes were statistically similar. The highest concentration of Pb(II) was detected for Sample A which particularly had a pH after collection more acidic than Samples B and C. Nevertheless, the concentration of Pb(II) determined in all the collected samples is below 10 μg L⁻¹ which is the permissible limit for drinking water established for Pb(II) by the Salvadoran authorities in the Mandatory Salvadoran Standards [22]. Related to the relative standard deviation (*RSD* %), using a Bi_{sp}SPE was at most 3.5 %, while for HMDE was not lower than 3.8 %. Thus, Bi_{sp}SPE is postulated as a good and less toxic substitute for mercury electrodes. Nevertheless, it should be noted that a larger deposition time (*t*_d = 360 s) was required for DPASV measurements using a Bi_{sp}SPE in comparison with an HMDE (*t*_d = 120 s). Even so, this required deposition time for Bi_{sp}SPE is on the order of that needed for other BiSPE such as the most frequently applied In-situ approach, but with the additional advantage that Bi_{sp}SPE does not require a Bi(III) plating solution and therefore heavy metal speciation is not disturbed.

Full Paper

ELECTROANALYSIS

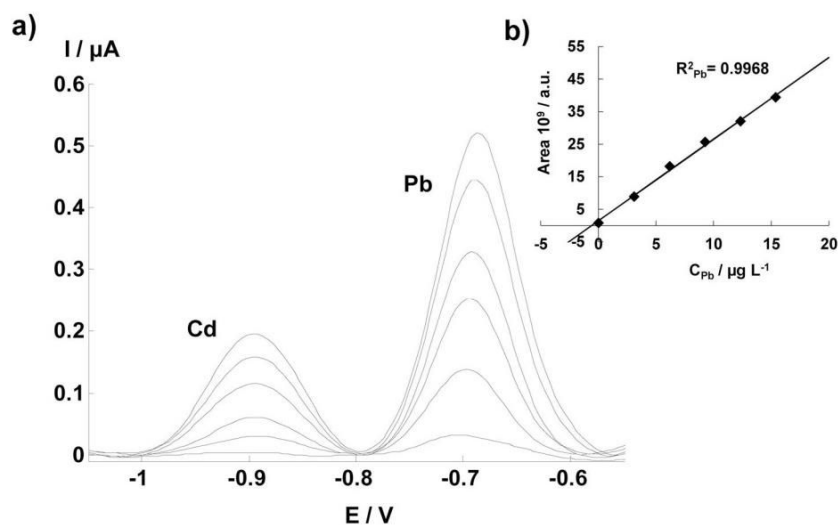


Fig. 1. a) Representative DPASV measurements in well water samples (Sample C) on Bi_{sp}SPE at pH 6.0 maleic/maleate buffer and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.20 V during a t_d of 360 s and t_r of 30 s; and b) standard addition plot for the determination of Pb(II).

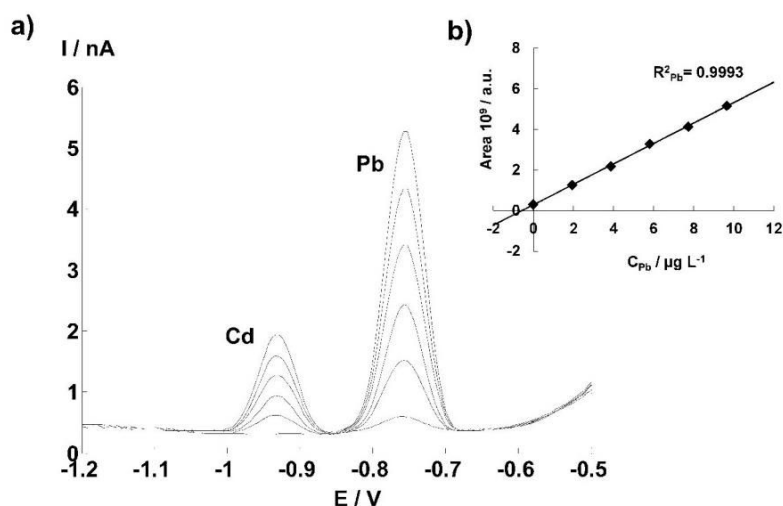


Fig. 2. a) Representative DPASV measurements in well water samples (Sample C) on HMDE at pH 6.0 maleic/maleate buffer and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength using a E_d of -1.20 V during a t_d of 120 s and t_r of 30 s; and b) standard addition plot for the determination of Pb(II).

Table 2. Total concentrations of Pb(II) and Cd(II) determined in three well water samples by DPASV on Bi_{sp}SPE and HMDE by standard addition calibration method at pH 6.0 and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength. General information such as GPS, pH after collection and conductivity is also provided for each sample. $n=3$ for RSD (%); n.d.: not detected.

	Sample A			Sample B			Sample C		
GPS	N 13° 47' 28.6" W 089° 22' 9.5"			N 13° 47' 29.0" W 089° 22' 1.4"			N 13° 47' 30.4" W 089° 21' 58.3"		
pH after collection	6.65			6.93			6.74		
Conductivity (mS cm ⁻¹)	0.834			0.843			0.704		
	Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Cadmium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Cadmium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Cadmium ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Bi _{sp} SPE	1.14	3.5	n. d.	0.67	3.1	n. d.	0.94	3.5	n. d.
HMDE	1.18	4.9	n. d.	0.71	4.4	n. d.	0.93	3.8	n. d.

Full Paper

ELECTROANALYSIS

3 Conclusions

The analytic performance of Bi_{sp}SPE compared with HMDE was studied for the simultaneous determination of Pb(II) and Cd(II) ions in real well water samples. At the sight of the results, it can be concluded that Bi_{sp}SPE could be an environmentally safe replacement to mercury electrodes for the analysis of trace heavy metals by DPASV. In addition, Bi_{sp}SPE has the characteristic advantages of SPEs such as the disposable character, the good reproducibility and the low-cost commercial availability. Moreover, Bi_{sp}SPE represents a notable improvement as compared to other BiSPE approaches since any plating or activation prior to its application are required and, the durability of the thick Bi film on every disposable screen-printed electrode allows a large set of measurements to be done with the same device in the same solution which is characteristic of standard addition analysis. Regarding its analytical behavior, Bi_{sp}SPE generates well-defined peaks for Pb(II) and Cd(II) without signal splitting in all the concentration range, although in comparison with more conventional HMDE higher deposition times are required. The obtained *LOD* and *LOQ* for both Bi_{sp}SPE and HMDE are very similar and on the order of $\mu\text{g L}^{-1}$ allowing the determination of Pb(II) and Cd(II) in the collected well water samples. When comparing Bi_{sp}SPE and HMDE results, no significant differences are noticed, both are able to provide Pb(II) concentrations with very high reproducibility inferred by the obtained relative standard deviation for each analyzed sample.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ2012-32863). Velia Sosa is grateful to Fundación Carolina for her Ph.D. grant.

References

- [1] J. H. Duffus, *Pure Appl. Chem.* **2002**, 74, 793–807.
- [2] A. Viarengo, *Rev. Aquat. Sci.* **1989**, 1, 295–317.
- [3] P. D. Abel, *Water Pollution Biology*, Ellis Horwood, Chichester, UK **1989**.
- [4] P. S. Rainbow, *Int. J. Environ. Stand.* **1985**, 25, 195–211.
- [5] E. Lawrence, A. R. W. Jackson, J. M. Jackson, *Logman Dictionary of Environmental Science*, Addison Wesley, Longman, Harlow, UK **1998**.
- [6] J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH, Deerfield Beach, FL **1985**.
- [7] J. Barek, A. G. Fogg, A. Muck, J. Zima, *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2001**, 31, 291–309.
- [8] J. Wang, J. Lu, S. B. Hocevar, P. A. M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* **2000**, 72, 3218–3222.
- [9] J. Wang, *Electroanalysis* **2005**, 17, 1341–1346.
- [10] A. Economou, *Trends Anal. Chem.* **2005**, 24, 334–340.
- [11] J. P. Hart, S. A. Wring, *Trends Anal. Chem.* **1997**, 16, 89–103.
- [12] K. C. Honeychurch, D. M. Hawkins, J. P. Hart, D. C. Cowell, *Talanta* **2002**, 57, 565–574.
- [13] R. O. Kadara, J. D. Newman, I. E. Tothill, *Anal. Chim. Acta* **2003**, 493, 95–104.
- [14] N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.* **2010**, 393, 1365–1369.
- [15] N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis* **2010**, 22, 1460–1467.
- [16] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* **2013**, 107, 356–360.
- [17] N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Trends Anal. Chem.* **2013**, 46, 15–29.
- [18] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* **2014**, 119, 348–352.
- [19] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, T. Speliotis, *Anal. Chim. Acta* **2008**, 622, 111–118.
- [20] C. Kokkinos, A. Economou, M. Koupparis, *Talanta* **2009**, 77, 1137–1142.
- [21] N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 6616–6622.
- [22] Mandatory Salvadoran Standards, NSO 13.07.01:08, Water, Drinking Water (2nd update), **2009**, Volume 383, number 109.

Received: June 27, 2014

Accepted: August 4, 2014

Published online: September 26, 2014

9.3. Can bismuth film screen printed carbon electrodes be used to study complexation?

Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Talanta 107 (2013) 356–360



Can bismuth film screen printed carbon electrodes be used to study complexation?

Velia Sosa, Núria Serrano, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1–11, Catalunya, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2012
Received in revised form
17 January 2013
Accepted 18 January 2013
Available online 1 February 2013

Keywords:

Bismuth film
Carbon screen printed electrodes
Complexation
Voltammetry

ABSTRACT

Ex situ bismuth film on commercial screen-printed carbon electrodes (BiSPCE) has been used for the first time for the analysis of the complexation of Cd^{2+} by thiol containing compounds as glutathione (GSH) and phytochelatin ($\gamma\text{-Glu-Cys}_2\text{-Gly}$ (PC_2)).

Reproducibility of data is quite satisfactory and allows their treatment by multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS). Unitary voltammograms and concentration profiles provided by MCR-ALS confirm the formation of 1:1 and 1:2 Cd^{2+} :GSH and 1:2 Cd^{2+} : PC_2 complexes. These results are in agreement with those previously obtained by mercury electrodes, and allow us to propose the use of BiSPCE for further studies on complexation.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Glutathione ($\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$, denoted usually as GSH) and its oligomers named phytochelatins ($(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, denoted usually as PC_n , where n generally ranges from 2 to 6) are thiol rich peptides which are synthesized enzymatically by plants in response to an excessive uptake of certain heavy metal ions [1–4]. The great affinity of the thiol group for heavy metals makes important the complexation by these thiol containing peptides not only for heavy metal detoxification but also for phytoremediation purposes [5–7].

The complexation of metals as Cd^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} and Cu^{2+} with GSH [8–10], mixtures of GSH and SeCyst [11], and PC_n [8–10,12–19] has already been studied by voltammetric methods in Hg electrodes. The resulting voltammetric data have been analyzed by chemometric methods as multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS) [8–10,14–18] and/or gaussian peak adjustment (GPA) [11,19] and a complexation sequence has been proposed for most of the analyzed systems. However, certain metal-thiol peptides systems present the difficulty that thiol favors the electroodic oxidation of the mercury of the electrode. This process generates anodic signals that are strongly overlapping with those related with the metal ion to be studied, making the analysis of these systems even more complicated [20,21]. By the other hand, a policy against the use of mercury as electroodic material has appeared in the last years due to its potential toxicity.

In the last decade bismuth electrodes have been postulated as a valuable alternative to mercury electrodes for the analysis of traces of heavy metals in environmental samples [22]. Despite the lower

toxicity of the bismuth electrodes and their versatility and diversity in use, only a significantly small number of papers is devoted to the heavy metal complexation by voltammetric techniques [23,24]. Particularly, in one of these previous works, the complexation of Pb(II) by GSH has been studied by differential pulse voltammetry (DPV) on an *ex situ* bismuth film electrode (BiFE), achieving a better resolution of the signals than on a mercury drop electrode (SMDE), and allowing a qualitative analysis of the complexation process (not possible on SMDE). In contrast, it was found that because of the more complex shape of the signals obtained for the Pb(II)-GSH system on BiFE, the DPV/MCR-ALS analysis could not be successfully applied and was unable to provide essential information on complex composition [24].

In this work, the study of the complexation of Cd(II)-GSH and Cd(II)-PC_2 on an *ex situ* bismuth film on commercial screen-printed carbon electrodes (BiSPCE) was carried out. Taking into account that BiSPCE increasingly gained advantage over the most conventional BiFE due to the improvement of many aspects, such as the disposable character, the minimised splitting of the metal peaks, their sensitivity and their linearity ranges [25–28], the aim of the present work is the evaluation of the applicability of the BiSPCE in the study of the Cd(II)-GSH and Cd(II)-PC_2 systems, and the subsequent treatment with MCR-ALS or GPA of the obtained data, allowing us the establishment of the stoichiometry of the possible complexes formed.

2. Experimental

2.1. Chemicals

A standard Bi(III) solution 1.000 g L^{-1} , atomic absorption standard solution, was purchased from Fluka. All others reagents used

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

were Merck analytical grade. Cd(II) stock solution 10^{-2} mol L $^{-1}$ was prepared from Cd(NO $_3$) $_2 \cdot 4$ H $_2$ O and standardized complexometrically. Glutathione (GSH), in the reduced form, was provided by Merck (γ -Glu-Cys) $_2$ Gly (PC $_2$), in lyophilized form with a purity >95%, was provided by Genosphere Biotechnologies France. Tris (hydroxymethyl) aminomethane, HCl buffer solution 0.1 mol L $^{-1}$ (pH 7.5 and pH 8.5) and KNO $_3$ 0.01 mol L $^{-1}$ were employed as supporting electrolyte. Ultrapure water (Milli-Q plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

2.2. Apparatus and measurements

Differential pulse voltammetric (DPV) measurements were performed on a bismuth screen printed carbon electrode (BiSPCE) in an Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie, The Netherlands) attached to a Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Switzerland) and a personal computer with GPES version 4.9 data acquisition software (EcoChemie).

The reference electrode (to which all potentials are referred) and the auxiliary electrode were Ag/AgCl/KCl (3 mol L $^{-1}$) and Pt wire, respectively.

The working electrode was a BiSPCE prepared from a commercial screen-printed carbon disk electrode of 4 mm diameter (ref. 110, DS SPCE) provided by DropSens (Spain) and connected to the Autolab by means of a flexible cable (ref. CAC, DropSens). A new BiSPCE was used for each voltammetric titration [25].

Ex situ bismuth coated method was selected in order to prevent the side reactions that can take place between Bi $^{3+}$ -ions and ligands.

All the measurements were carried out in a glass cell at room temperature (20 °C) under a purified nitrogen atmosphere (Linde N50) in order to prevent the possible oxidation of the thiol compounds.

Unless otherwise indicated, a pulse of 50 mV and a potential step of 2 mV were applied.

2.3. Ex situ preparation of BiSPCE

The SPCE, the reference, and the auxiliary electrodes were connected to the stand and immersed into 20 mL of a 0.2 mol L $^{-1}$ acetate buffer solution (pH 4.5) containing 100 ppm Bi(III). After deaeration of the solution for 10 min, a deposition potential of -0.80 V was applied for 300 s with solution stirring, followed by a rest period (without stirring) of 20 s.

Once the bismuth film was deposited, the three electrodes were rinsed carefully with water and the Bi(III) solution was replaced in the cell by the one to be measured. This methodology was previously tested, and results showed a very high repetitivity and reproducibility [25].

2.4. Procedure

Voltammetric titrations of Cd(II) with ligand (direct titrations) started by placing in the cell 20 mL of 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ Cd(II) solution in 0.1 mol L $^{-1}$ Tris (hydroxymethyl) aminomethane, HCl buffer solution and 0.01 mol L $^{-1}$ KNO $_3$. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 20 min and a DPV curve was recorded. Aliquots containing 4×10^{-4} mol L $^{-1}$ of ligand solution were added and, after purging and mechanically stirring the solution for 1 min, the respective DPV curves were recorded. Voltammetric titrations of 20 mL of 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ ligand solution with 4×10^{-4} mol L $^{-1}$ of Cd(II) solution (reverse titrations) were also performed following the same procedure.

2.5. Data treatment

The DPV curves were smoothed, base line corrected, and converted into data matrices by means of homemade programs implemented in Matlab [29]. The application of MCR-ALS [30] and GPA [31] methods to the analysis of matrices constituted by voltammetric data have been described elsewhere. MCR-ALS and GPA analyses were carried out through several programs implemented in MATLAB (some of them available at <http://www.ub.edu/mcr/html> and http://www.ub.edu/dqalc/programes_eng.html).

3. Results and discussion

3.1. Cd(II)–GSH system

The complexation study of the Cd(II)–GSH system was carried out on BiSPCE at pH values of 7.5 and 8.5. Titrations of 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ Cd(II) solution with GSH (direct titration) until a GSH:Cd $^{2+}$ ratio value of 3, and those of 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ GSH solution with Cd(II) (reverse titration) until a Cd $^{2+}$:GSH ratio value of 2.25, were done. In both cases the obtained voltammograms were arranged in a data matrix with as many rows as different [GSH]/[Cd(II)] or [Cd(II)]/[GSH] ratios were considered, and as many columns as the number of registered potentials.

Fig. 1 shows the voltammograms obtained in both direct (Fig. 1a) and reverse (Fig. 1b) titrations at pH 7.5. MCR-ALS and GPA analyses were applied to both voltammetric titrations. At a first inspection several components can be observed in all cases, being every component interpreted as every single electrochemical process which contributes to the measured signal [32]. Thus, component 1 is

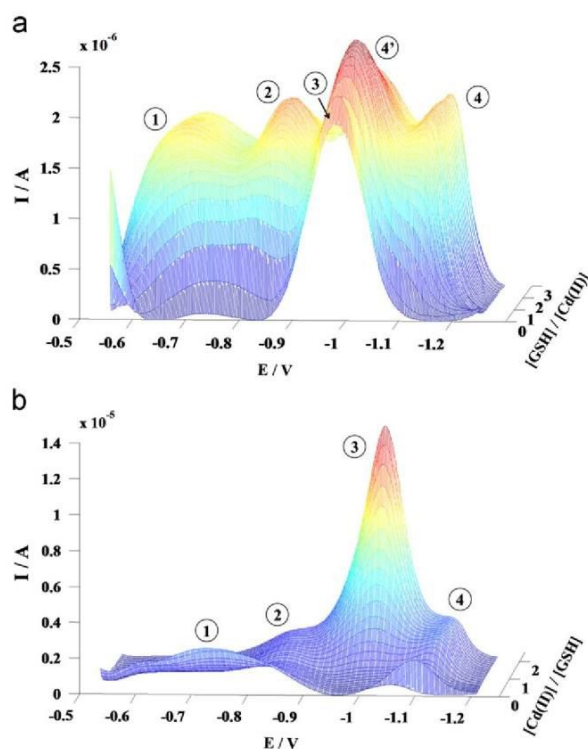


Fig. 1. Experimental data matrix of a 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ Cd(II) solution titrated with GSH (a) of a 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ GSH solution titrated with Cd(II) (b); both titrations were performed at pH 7.5 and ionic strength 0.01 mol L $^{-1}$ KNO $_3$.

associated with the anodic signal of the electrode material related with the free ligand [24], component 2 corresponds to an anodic signal, but now related with the formed complexes [20,21,24], component 3 is related with the reduction process of the free metal ion and component 4 and 4' correspond to the reduction processes of the formed complexes (reduction of the bound metal). Particularly, component 4', only observed in direct titration, could be associated to a weak Cd(II)–GSH complex, whereas component 4 is related to a more stable Cd(II)–GSH complex.

In the study of Cd(II)–GSH system, direct titration (Fig. 1a) was only used to obtain qualitative information about the processes occurred during the titration, since the strong overlapping between the signal of the free Cd(II) reduction (component 3) and the signal of the weaker Cd(II)–GSH complex (component 4') does not allow an accurate analysis of the data matrix neither by MCR-ALS nor by GPA. However, the most important information about the complexation processes of the systems is commonly obtained from the data of the reverse titration which, moreover, simulates in a better way a real contamination case of a natural system by Cd(II) ions.

The evolution of the DP voltammograms when Cd(II) is added to a GSH solution (Fig. 1b) shows an initial broad peak (component 1), with a maximum at ca. -0.73 V, attributed to the anodic signal of GSH. With the first additions of Cd(II) this signal decreases and a peak at ca. -1.07 V appears due to the formation of a Cd(II)–GSH complex (component 4). After some additions of Cd(II), the complete disappearance of the anodic signal of the GSH is observed, which allows to observe the presence of a peak at ca. -0.85 V (component 2) that behaves similarly to the signal of the formed complex, indicating its relation with an anodic signal associated with this complex. Finally, at Cd(II)-to-GSH ratios higher than 0.5, it is possible to distinguish a new sharp peak at ca. -1.01 V (component 3) corresponding to the reduction of free Cd(II) at the same time as the signals related with the Cd(II)–GSH complex seem to stabilize.

The general evolution of the Cd(II)–GSH system studied by BiSPCE is equivalent to that obtained in previous works with mercury electrode [33] and, moreover, the currents of the voltammetric signals obtained using the BiSPCE are even higher than those achieved in a mercury electrode because of the largest Bi working surface.

MCR-ALS analysis of the data matrix obtained from the DPV titration of GSH with Cd(II) (Fig. 1b) achieves the best results (lack of fit 9.73%) using 4 components and the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals), peak-shape for all components, and selectivity for components 2 and 4. Fig. 2 summarizes the resulting unitary voltammograms (a) and the

concentration profiles (b) plotted in front of the Cd(II)-to-GSH ratio.

Although some ambiguities possibly due to the strong overlapping of the signals and the excessive weight of the free metal peak, the analysis of the concentration profile (Fig. 2b) confirms the qualitative behavior of the Cd(II)–GSH system described above. The evolution of the concentration profiles (Fig. 2b) shows that component 1 suffers a progressive decrease from the first addition of Cd(II) that seems to tend to [Cd(II)]/[GSH] ratio of 0.5, although it does not disappear completely. The persistence of component 1 at higher Cd(II)-to-GSH ratios could be due to the fact that its asymmetric peak shape (see unitary voltammograms of component 1 in Fig. 2a) together with the overlapping of signals of components 2–4 causes some ambiguities in the MCR-ALS treatment. On the contrary, the concentration profile of component 3 attributed to free Cd(II) starts to appear at ratio ca. 0.5, supporting the formation of the Cd(GSH)₂ complex. But, if only the 1:2 Cd²⁺:GSH complex was formed, the concentration profile of component 4 (Cd(II)–GSH complexes) should be stabilized at [Cd(II)]/[GSH] ratio around 0.5. The stabilization of this component at ratios ca. 1 indicates that the 1:1 Cd²⁺:GSH complex could be also formed when an excess of cadmium is present in the medium. Similar conclusions were obtained from the analysis of the titrations of the Cd(II)–GSH system at pH 8.5 (data not shown). This behavior is in accordance with the existing results obtained using a mercury electrode where a model for the complexation of Cd(II) by GSH involving the formation of Cd(GSH)₂ and Cd₂(GSH)₂ was proposed [33]. This good agreement between BiSPCE and mercury electrode results points out the possibility to use this environmentally safe device to follow easily the complexation process of Cd(II)–GSH system.

3.2. Cd(II)–PC₂ system

A similar study was accomplished to investigate the complexation of Cd(II)–PC₂ system on BiSPCE. Both direct (addition of the peptide to a 1×10^{-5} mol L⁻¹ Cd(II) solution) and reverse (addition of Cd(II) to a 1×10^{-5} mol L⁻¹ peptide solution) DPV titrations were carried out at pH 8.5. As in the case of Cd(II)–GSH system, direct titration (data not shown) provides qualitative information about the behavior of the system. The evolution of the DP voltammograms obtained in the reverse titration of the Cd(II)–PC₂ system (Fig. 3a) shows an initial wide peak (component 1) at ca. -0.98 V associated with the anodic signal of the electrode material related with the free PC₂. After successive additions of Cd(II), this peak is decreasing and simultaneously a new peak (component 3), at ca. -1.30 V, is increasing. This peak is related with the Cd(II)–PC₂ complex. Finally, a peak at

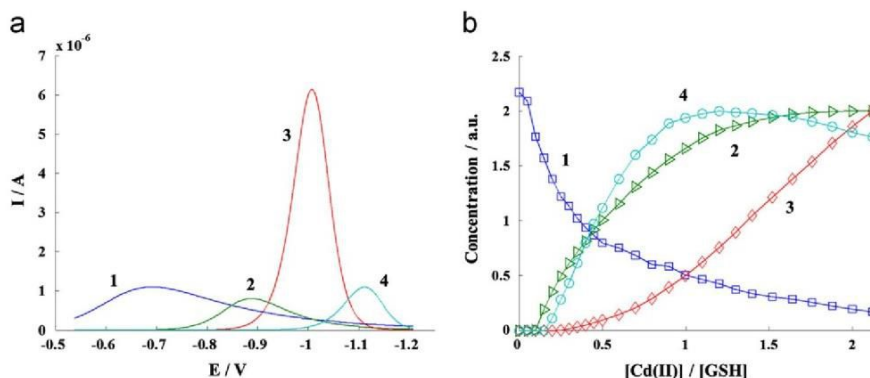


Fig. 2. Normalized unitary response vectors (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS decomposition of DPV data matrix shown in Fig. 1(b). Components assignments: (1)—anodic signal of the free GSH; (2)—anodic signal of the Cd(II)–GSH complexes; (3)—Cd(II)-ion; (4)—Cd(II)–GSH complexes.

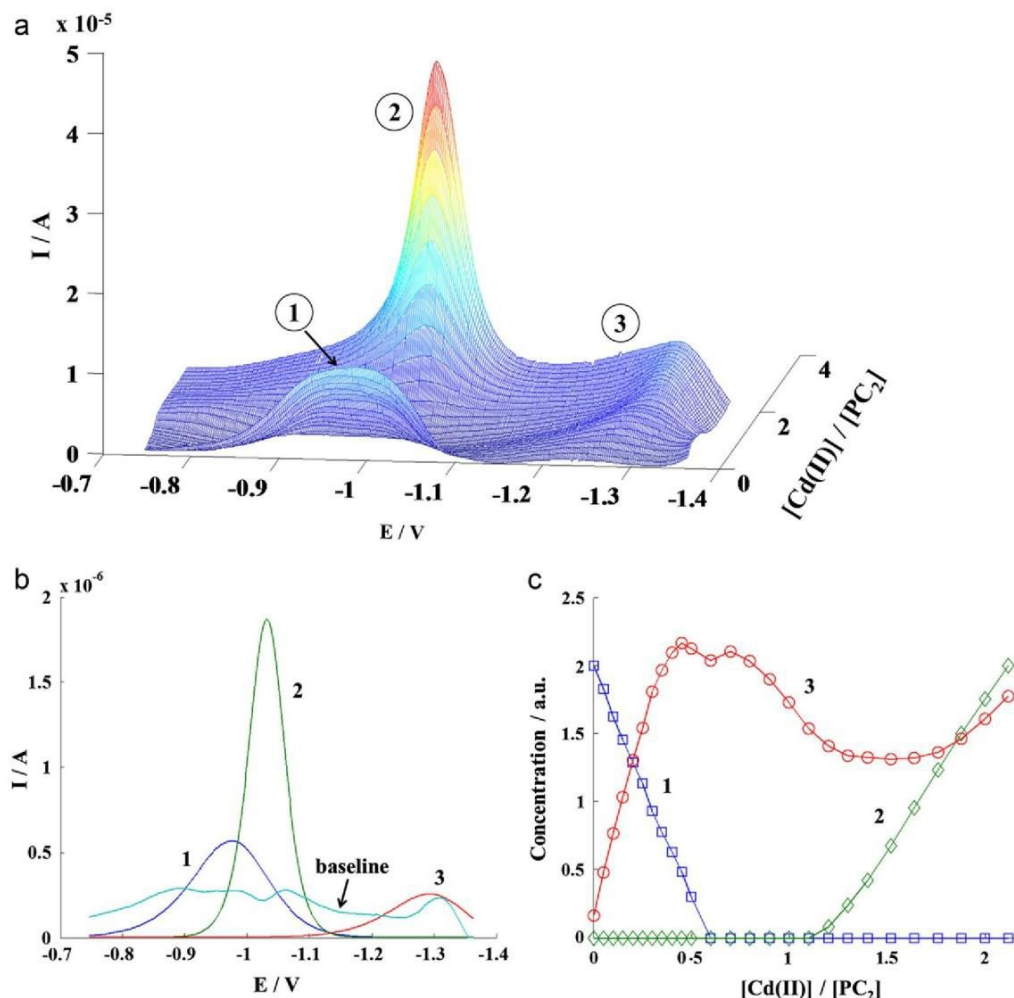


Fig. 3. (a) DPV voltammograms obtained in the titration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ PC_2 solution with Cd(II) at pH 8.5 and ionic strength 0.01 mol L^{-1} KNO_3 . (b) normalized unitary response vectors estimated from the result of a previous unrestricted MCR-ALS analysis and optimized along shape-restricted MCR-ALS procedure. (c) concentration profiles obtained by MCR-ALS. Components assignments: (1)—anodic signal of the free PC_2 ; (2)— Cd(II) -ion; (3)— Cd(II) - PC_2 complex.

ca. -1.03 V , which is attributed to the free metal ion (component 2), is growing with the addition of Cd(II) . If we compare the behavior of this system with the previous Cd(II) -GSH one, some differences are appreciated: (i) the anodic signal of the electrode material related with the free PC_2 (component 1) and the signal associated with the Cd(II) - PC_2 complex (component 3) appear at more negative potential values than those equivalent in the Cd(II) -GSH system. This is due to the higher stability of the binding between Cd(II) and PC_2 in comparison with Cd(II) -GSH since, in general, the more negative the reduction peak potential value, the stronger the metal-ligand bond [10]; and ii) the peak related with the anodic signal of the complexes (component 2 in the Cd(II) -GSH system, Figs. 1 and 2) appears only as a distortion of the baseline due to the more irregular shape of the voltammograms obtained in the case of the Cd(II) - PC_2 system.

The application of the MCR-ALS analysis to the data matrix obtained in the titration of PC_2 with Cd(II) solution revealed that neither considering three components (the anodic signal of the ligand, the signal of the free metal ion and the signal of the Cd(II) - PC_2 complex) or four components (the anodic signal of the ligand, the signal of the free metal ion, the signal of the Cd(II) - PC_2 complex and its anodic signal) convergence was reached. Nevertheless, a lack

of fit of 10.92% was achieved if apart from the three basic components an additional component related with the baseline was considered. The addition of this component, that has not a peak shape, is useful for the correction of the distortion of the original baseline and can be justified after a careful observation and a preliminary analysis of the data matrix (Fig. 3a). The constraints of non-negativity for concentrations and voltammograms, peak shape for all components except the component associated with the baseline, and selectivity for components 1 and 2 were applied in this data treatment. The unitary voltammograms and the concentration profiles provided by MCR-ALS are shown in Fig. 3b and c, respectively. Component 1 disappears at the same time that component 3 increases, until a Cd(II) -to- PC_2 ratio of 0.5, in which component 3 progressively stabilizes and component 1 completely disappears suggesting, in agreement with previous studies [10,18], the formation of $1:2 \text{ Cd}^{2+}:\text{PC}_2$ complex. However, component 2 does not appear until a Cd(II) -to- PC_2 ratio about 1, suggesting the formation of a $1:1$ or $2:2 \text{ Cd}^{2+}:\text{PC}_2$ complex whose signal is not visible. This unusual fact could be explained taking into consideration the intricate shape of the DP voltammograms that required the introduction of a baseline component in the MCR-ALS treatment that could hide a too small or too wide signal of such $1:1$ complex.

Finally, these results confirm again the goodness of the BiSPCE for the following of the complexation process of the Cd(II)–PC₂ system.

4. Conclusions

Ex situ BiSCPE appears to be a valuable alternative to both mercury and BiFE electrodes for the electrochemical and chemometric study of metal complexation by thiol-rich peptides, as suggested by the study of Cd(II)–GSH and Cd(II)–PC₂ system. On the one hand, bismuth based electrodes present the advantage of being environmentally friendly with quite close features to mercury ones. On the other hand, BiSPCE, as compared to BiFE, does not present any signal splitting for the Cd(II) ion and, because of the accessible and low-cost character of screen-printed electrodes, ensures a user-friendly methodology.

Moreover, the described voltammetric behavior of the Cd(II)–GSH and Cd(II)–PC₂ systems on BiSPCE is similar to that observed on mercury electrodes. Furthermore, MCR-ALS analysis has been applied for the first time to a data matrix obtained on BiSPCE providing abundant information about the complexation process of the systems. Despite some uncertainties attributed to the intricate shape of the obtained voltammograms, especially in the case of the Cd(II)–PC₂ system, the formation of the 1:2 and 1:1 Cd²⁺:GSH and 1:2 Cd²⁺:PC₂ complexes was observed, in full agreement with the results obtained with mercury electrodes.

Acknowledgment

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, projects CTQ2009-09471 and CTQ2012-32863). Velia Sosa is grateful to Fundación Carolina for her Ph.D. grant.

References

- [1] D. Dolphin, O. Avramovic, R. Poulson (Eds.), Chemical, Biochemical and Medical Aspects, Part A, Wiley, New York, 1989.
- [2] W.E. Rauser, *Physiol. Plant.* 109 (1995) 1141–1149.
- [3] E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk, *Science* 230 (1985) 674–676.
- [4] M.H. Zenk, *Gene* 179 (1996) 21–30.
- [5] S.C. McCutcheon, J.L. Schnoor, *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, John Wiley & Sons, New York, 2003.
- [6] I. Raskin, B.D. Ensley, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, John Wiley & Sons, New York, 2000.
- [7] B. Suresh, G.A. Ravishankar, *Crit. Rev. Biotechnol.* 24 (2004) 97–124.
- [8] N. Serrano, I. Sestáková, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, J. Electroanal. Chem. 591 (2006) 105–117, and references cited therein.
- [9] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Biochem.* 375 (2008) 82–89, and references cited therein.
- [10] R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Biochem.* 406 (2010) 61–69.
- [11] R. Gusmão, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Biol. Inorg. Chem.* 17 (2012) 321–329, and references cited therein.
- [12] G. Scarano, E. Morelli, *Electroanalysis* 10 (1998) 39.
- [13] I. Sestakova, H. Vodickova, P. Mader, *Electroanalysis* 10 (1998) 764.
- [14] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 778–786.
- [15] A. Alberich, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* 71 (2007) 344–352.
- [16] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2860–2866, and references cited therein.
- [17] R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9006–9013, and references cited therein.
- [18] R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Analyst* 135 (2010) 86–95, and references cited there in.
- [19] S. Cavanillas, R. Gusmão, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Electroanalysis* 24 (2012) 309–315, and references cited therein.
- [20] J.M. Sequaris, *Comp. Anal. Chem.* 27 (1992) 115–157.
- [21] E. Casassas, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* 194 (1985) 11–25.
- [22] I. Svancara, C. Prior, S.B. Hocevar, J. Wang, *Electroanalysis* 22 (2010) 1405–1420.
- [23] N. Serrano, N. Martín, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis* 21 (2009) 431.
- [24] A. Alberich, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* 78 (2009) 1017–1022.
- [25] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis* 22 (13) (2010) 1460–1467.
- [26] O. Domínguez Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J. Arcos Martínez, *Talanta* 73 (2007) 202–219.
- [27] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton, *Anal. Lett.* 37 (2004) 789–830.
- [28] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Trends Anal. Chem.* (2013), accepted for publication.
- [29] Matlab, version R2008b ed.; Mathworks Inc.: Natick, MA, USA, 2008.
- [30] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Chemometrics in electrochemistry*, in: S.D. Brown, R. Tauler, B. Walczak (Eds.), *Comprehensive Chemometrics* vol. 4, Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier Science, Oxford, 2009.
- [31] S. Cavanillas, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Chim. Acta* 689 (2011) 198–205.
- [32] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49–61.
- [33] M.S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, *J. Inorg. Biochem.* 66 (1997) 29–36.

9.4. Discusión de resultados

9.4.1. Aplicación de electrodos serigrafiados de bismuto en la determinación de metales pesados en muestras naturales

En el primer artículo (Trabajo 1) se realizó un estudio comparativo entre los diferentes BiSPE, y se aplicó a la determinación de metales en un material de referencia certificado que demostró las posibilidades de estos dispositivos en este tipo de estudios. En el segundo artículo (Trabajo 2) se evaluaron las posibilidades del Bi_{sp}SPE de cara a su aplicación en la determinación de metales pesados en muestras reales, en este caso se consideraron muestras de aguas de pozos de El Salvador. Se utilizó también un HMDE para la determinación de los metales en estas muestras de agua, y así comparar los resultados obtenidos entre ambos electrodos.

En primer lugar se realizó la caracterización de la superficie morfológica de los BiSPEs utilizados en estos estudios, la cual se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido JSM7100FE de JEOL (Japón). En la Figura 15 se pueden ver las imágenes SEM obtenidas con un aumento de 20.000x de un electrodo SPCE sin modificar y los diferentes BiSPEs estudiados. La micrografía de la superficie de un electrodo SPCE sin modificar (Figura 15a o Figura 1a del Trabajo 1) muestra una superficie de carbono bastante uniforme en comparación con las superficies de los BiSPE (Figura 15b-f o Figura 1 b-f del Trabajo 1). La Figura 15b y c corresponden a las imágenes SEM de los electrodos *in-situ* BiSPCE, y *ex-situ* BiSPCE respectivamente, en los cuales se puede observar el Bi depositado (especialmente en la superficie del electrodo *ex-situ* BiSPCE). Sin embargo, se aprecia que en ninguno de los dos casos la película de Bi formada cubre completamente la superficie de carbono. Las Figura 15d y Figura 15e muestran las superficies del Bi_{ox}SPCE antes y después de la reducción electroquímica del óxido de bismuto (III). Antes de la reducción electroquímica las partículas del Bi₂O₃ están uniformemente distribuidas a lo largo de la superficie del electrodo y después de la reducción a Bi metálico, se puede ver una superficie uniforme, bastante diferente a la superficie del *in-situ* BiSPCE y *ex-situ* BiSPCE. Indicar que únicamente la imagen del *ex-situ* BiSPCE (Figura 15c) muestra claramente una estructura granular de partículas asociadas a los depósitos de Bi pero más pequeñas (que las que se observan en la Figura 15f). Entre esta estructura granular se observan claramente otras partículas cristalinas de

depósitos de Bi visiblemente claras de forma alargada, menos numerosas, y distribuidas al azar. En cuanto al Bi_{sp}SPE, a simple vista ya se observa que el electrodo de trabajo presenta un color (gris claro) muy diferente al color negro que muestran el resto de BiSPEs debido al sustrato de carbono. La imagen del Bi_{sp}SPE (Figura 15f) muestra una morfología totalmente distinta a la del resto de los BiSPEs. Las principales diferencias son que el sustrato de este electrodo es cerámico en lugar de carbono y la técnica de deposición de Bi sobre la superficie cerámica se realiza por *sputtering*, lo que da lugar a una superficie con una estructura granular debido al bismuto depositado. La comparación de las micrografías electrónicas de los electrodos hace evidente las diferencias entre las superficies morfológicas de los diferentes BiSPEs, lo que podría influir en su comportamiento electroanalítico.

Los datos del calibrado para la determinación simultánea de Cd(II) y Pb(II) utilizando los electrodos *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE, Bi_{ox}SPCE, Bi_{sp}SPE y HMDE por DPASV, se presentan en la Tabla 1 de los Trabajos 1 y 2. Como se puede observar los límites de detección (LODs) obtenidos son muy favorables en todos los casos. El límite inferior del intervalo lineal se estableció a partir del correspondiente límite de cuantificación (LOQ). Los LODs y los LOQs se obtuvieron considerando tres y diez veces, respectivamente, la desviación standard de la ordenada en el origen en relación con la pendiente de la curva de calibrado del metal. Para establecer las rectas de calibrado y poder así calcular los LODs y LOQs, se consideraron curvas de calibración con al menos diez puntos. En todos los casos se obtuvieron picos de redisolución bien definidos para el Cd(II) y Pb(II) con los electrodos *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE, y Bi_{sp}SPE. Sin embargo, con el Bi_{ox}SPCE se obtienen únicamente picos bien definidos para ambos metales a bajas concentraciones, pero al aumentar la concentración el pico de cadmio presenta un desdoblamiento y el pico del plomo pierde simetría. Un comportamiento similar ya se observó en estudios previos utilizando un electrodo vía *ex-situ* BiFE [130]. Una posible explicación para este comportamiento podría estar relacionada con la etapa de electrodeposición en la que podrían estar involucrados dos mecanismos diferentes, uno con el bismuto y el otro con la superficie de la base del electrodo. Como consecuencia de este comportamiento, en el caso de la determinación del cadmio se consideró para llevar a cabo las medidas el área total de ambos picos.

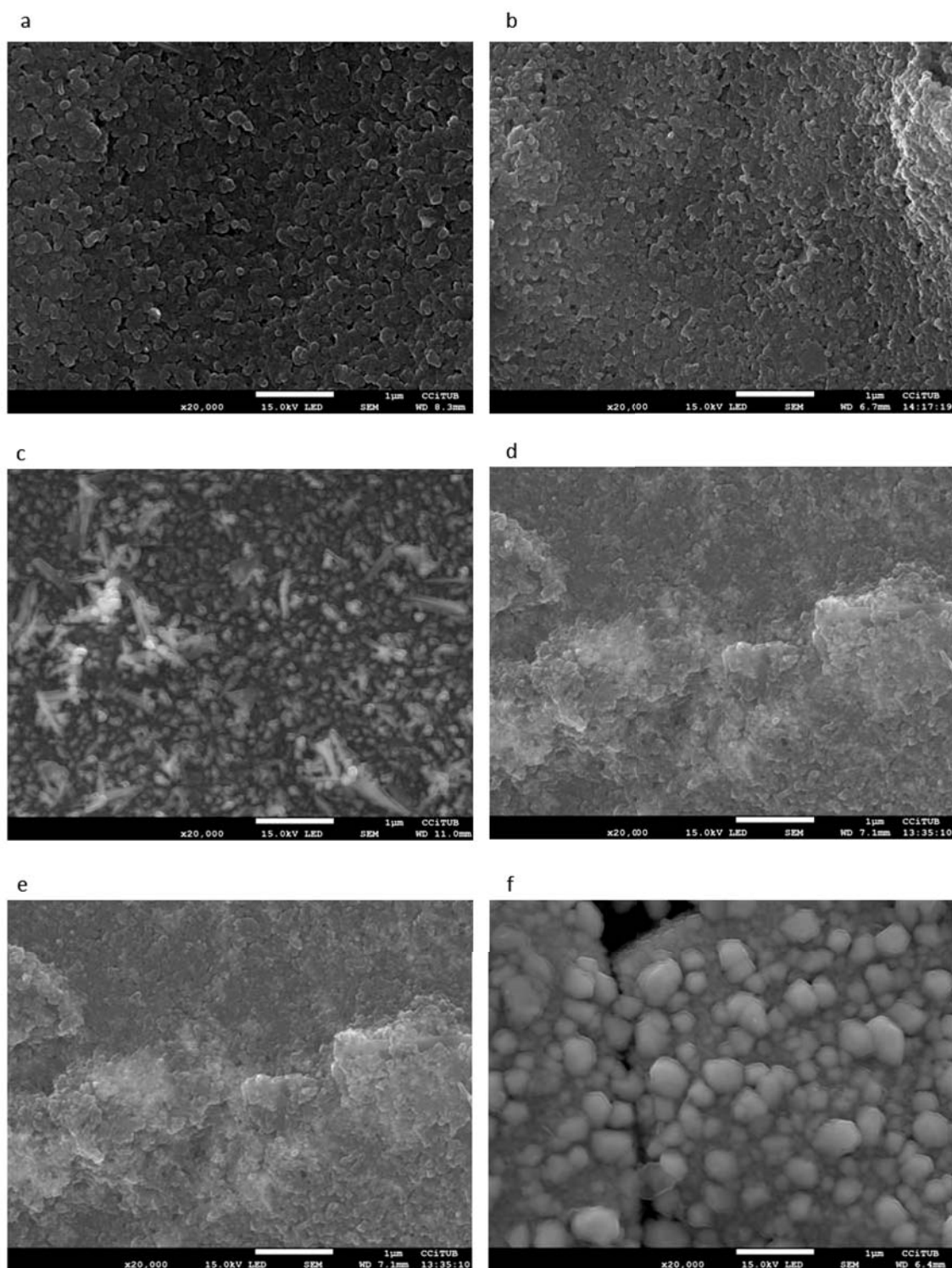


Figura 15. Micrográficas: a) electrodo comercial serigrafiado de carbono (SPCE) sin modificar. Electrodo de bismuto modificados: b) vía *in-situ*, c) vía *ex-situ*; d) BiO_x/SPCE antes de la reducción electroquímica del Bi(III) ; e) BiO_x/SPCE después de la reducción electroquímica del Bi(III) a un E_d de $-1,2$ V durante 600 s en una disolución de KOH a $0,1 \text{ mol L}^{-1}$; y f) electrodo serigrafiado con película de bismuto preparada con la técnica de *sputtering* comercial. Utilizando resolución de $1 \mu\text{m}$, magnificación de $20.000\times$ y potencial de aceleración de $15,0 \text{ kV}$.

Con todos los BiSPEs se obtuvo una excelente linealidad entre el área de los picos y la concentración de Cd(II) y Pb(II) y los LODs obtenidos son ligeramente más bajos que los reportados en estudios similares [38]. En el caso del Bi_{sp}SPE no se han reportado en la literatura valores de LOQ para estos metales por DPASV. Sin embargo, en un estudio en el que se preparó un electrodo de bismuto mediante la técnica de *sputtering* se reportaron LODs de 0,5 µg L⁻¹ para el Pb(II) y 1,0 µg L⁻¹ para el Cd(II) mediante SWASV [77], por lo que los valores de LOD de Cd(II) y Pb(II) obtenidos con el Bi_{sp}SPE en nuestro estudio por DPASV son menores.

Como se puede observar en las Tablas 1 de ambos artículos, al hacer un estudio comparativo en el primer trabajo de los BiSPEs, los LODs más bajos para Cd(II) se obtuvieron con los Bi_{ox}SPCE y Bi_{sp}SPE, y éstos son comparables al LOD obtenido con el HMDE en el segundo estudio. El electrodo que presenta un menor LOD es el *ex-situ* BiSPCE, mientras que el mayor LOD para el Cd(II) se obtuvo con el *in-situ* BiSPCE.

En el caso del Pb(II) el menor LOD se obtuvo con el *ex-situ* BiSPCE, seguido del Bi_{ox}SPCE y del Bi_{sp}SPE, que presentan valores equivalentes; el valor más alto de LOD se obtuvo con el *in-situ* BiSPCE, pero no es muy diferente a los LODs obtenidos con los otros BiSPE.

En este punto cabe indicar que los favorables LOD obtenidos con los Bi_{ox}SPCE son engañosos ya que las señales que proporcionan presentan anomalías, que aunque se pueden solventar midiendo los picos adecuadamente, dificultan la determinación.

Los LODs obtenidos para el Cd(II) y el Pb(II) utilizando los electrodos *in-situ* BiSPCE y *ex-situ* BiSPCE son un poco más bajos comparados con los reportados en otros estudios previos [38]. Respecto al Bi_{ox}SPCE los LODs obtenidos tanto para el Cd(II) como para el Pb(II) son más bajos que los que se muestran en estudios previos [145]. A pesar que no se han encontrado trabajos con el Bi_{sp}SPE, los datos obtenidos sugieren que este dispositivo puede ser una alternativa al HMDE para la determinación de Cd(II) y Pb(II) en muestras naturales. Es importante aclarar que este dispositivo no requiere un pretratamiento del electrodo.

La aplicación de los diferentes BiSPEs para el análisis de Cd(II) y Pb(II) tanto del material de referencia certificado, como para las aguas de pozos se llevó a cabo aplicando el método de calibrado de las adiciones estándar.

Es importante aclarar que para los electrodos *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE y Bi_{sp}SPE se utilizó el mismo dispositivo electródico para realizar las medida correspondientes al análisis completo de una muestra; sin embargo, con el Bi_{ox}SPCE fue necesario utilizar un nuevo dispositivo para cada medida con DPASV, debido a que se observó deterioro del electrodo después de cada medida. Al realizar el análisis del material de referencia certificado (agua subterránea) se obtuvieron picos definidos para ambos metales con los electrodos *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE y Bi_{sp}SPE; cuando se utiliza el Bi_{ox}SPCE se obtuvieron picos de redisolución definidos antes de hacer las adiciones pero después de adicionar los metales, el pico del Cd(II) se desdobló en dos picos tal y como ocurrió en el estudio de los parámetros de calibrado (ver Figuras 4 del Trabajo 1).

La Tabla 2 de este artículo, muestra la bondad de los resultados obtenidos, que se reflejan al analizar los valores de desviación estándar relativa y del error relativo obtenido. Estos resultados demuestran la aplicabilidad de los BiSPCE en la determinación de metales pesados a nivel traza y remarca el mejor comportamiento del BiSPE frente a las otras modificaciones.

Los resultados de este trabajo mostraban la necesidad de validar la viabilidad de estos dispositivos de bismuto, en concreto del Bi_{sp}SPE frente al HMDE utilizado ampliamente en electroquímica para determinación de iones metálicos a niveles de concentración muy bajos. Ambos dispositivos se aplicaron a la determinación de Pb(II) y Cd(II) en muestras de aguas de pozos provenientes de una zona de El Salvador afectada por contaminación con plomo. En este estudio, que dio lugar al Trabajo 2, inicialmente también se evaluaron los parámetros de calibrado que ya se han comentado anteriormente. Únicamente decir que en este trabajo se utilizó un intervalo de concentraciones más pequeño para el Pb(II) y un poco más grande para el Cd(II) en comparación a los considerados en el primer estudio (Trabajo 1). Se aplicaron los mismos potenciales de deposición para el Bi_{sp}SPE y el HMDE; y un tiempo de deposición de 360 s para el Bi_{sp}SPE y de 120 s para el HMDE.

La determinación de Pb(II) y de Cd(II) en las tres muestras de aguas de pozos se realizó con el método de las adiciones estándar, tomando tres alícuotas de cada una de las tres muestras. El análisis de cada muestra se realizó después de ajustar el pH a 6.0 de cada alícuota de la muestra con la solución amortiguadora de maleico/maleato. En este estudio únicamente fue posible la cuantificación de Pb(II) utilizando el Bi_{sp}SPE y el HMDE, mientras que el Cd(II) no presentó ninguna señal en ninguno de los electrodos

lo que indicó que su concentración se encontraba por debajo del LOD. En la Tabla 2, y en la Figura 1 y Figura 2 del Trabajo 2 se muestran los resultados obtenidos.

Los resultados obtenidos con ambos electrodos son estadísticamente similares, tal como lo demuestra la prueba t de dos colas aplicada a los resultados obtenidos con ambos electrodos, para un nivel de confianza del 95 %. La mayor concentración de plomo se determinó en la muestra A, seguida por la muestra B y C, sin embargo todas las muestras presentaron concentraciones inferiores a $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (límite máximo de Pb(II) permitido en agua de consumo humano por la Norma Salvadoreña NSO 13.07.01.08).

En la Tabla 8 se presentan a modo de resumen las ventajas y desventajas de los diferentes BiSPEs utilizados en los estudios que dieron lugar a las dos primeras publicaciones.

Tabla 8. Ventaja y desventajas de los BiSPEs.

Electrodo	Ventajas	Desventajas
Bi _{ox} SPCE	• Comparado a los electrodos preparados vía <i>in-situ</i> y <i>ex-situ</i> no se necesita una solución de Bi(III) para formar la película. • Los t_d requeridos son más cortos que con los otros dispositivos.	• Es necesario activar la película de Bi mediante reducción directa del precursor. • La señal de Cd(II) presenta pico desdoblado al aumentar la concentración. • Se necesita un nuevo dispositivo para cada medida. • El coste del dispositivo es mayor que el de un SPCE utilizado para preparar los BiSPE vía <i>in-situ</i> o <i>ex-situ</i>.
<i>Ex-situ</i> BiSPCE	• Requiere menor t_d comparado con el <i>in-situ</i> BiSPCE y el Bi_{sp}SPE. • Presenta picos muy definidos tanto para el Cd(II) como para el Pb(II). • El dispositivo se puede utilizar para realizar varias medidas completando el análisis de una réplica de una muestra o de una curva de calibrado. • Son una opción para estudios en los que la presencia de Bi(III) puede afectar la especiación de los metales de la muestra. • Se prepara a partir de un SPCE por lo que su coste es menor que el Bi_{ox}SPCE y el Bi_{sp}SPE.	• Necesita una etapa previa de preparación de la película del electrodo. • Se necesita una disolución de Bi(III).
<i>In-situ</i> BiSPCE	• No requiere preparación previa de la película, por lo cual se requiere menor tiempo para el análisis de muestra comparado al <i>ex-situ</i> BiSPCE. • Necesita menor t_d que el Bi_{sp}SPE. • Presenta picos bien definidos tanto para el Cd(II) como para el Pb(II). • Al igual que con el electrodo de Bi preparado vía <i>ex-situ</i> el dispositivo se puede utilizar para realizar varias medidas, completando el análisis de una réplica de una muestra o de una curva de calibrado. • Se prepara a partir de un SPCE por lo que su coste es menor que el Bi_{ox}SPCE y el Bi_{sp}SPE.	• Sí se necesita una disolución de Bi(III). • Requiere mayor t_d que el Bi_{ox}SPCE y que el <i>ex-situ</i> BiSPCE. • No son una opción para estudios en los que la presencia de iones Bi³⁺ puede afectar la especiación de los metales de la muestra.
Bi _{sp} SPE	• El electrodo no necesita ningún tipo de preparación previa. • Presenta picos definidos tanto para el Cd(II) como para el Pb(II). • Al igual que con el electrodo de Bi preparado vía <i>ex-situ</i> e <i>in-situ</i> se puede utilizar para realizar varias medidas, completando el análisis de una réplica de una muestra o de una curva de calibrado. • Podrían ser una opción para estudios en los que la presencia de iones Bi³⁺ puede afectar la especiación de los metales en la muestra.	• Requiere mayor t_d que los otros BiSPE. • Su coste es mayor que el de los BiSPE obtenidos modificando un SPCE vía <i>in-situ</i> o <i>ex-situ</i>, y que el Bi_{ox}SPCE. • Necesita mayor t_d comparado a los otros BiSPE.

9.4.2. Estudio de complejación

Teniendo en cuenta las posibilidades que presentan los electrodos serigrafiados modificados con bismuto en la determinación de metales pesados, se consideró oportuno estudiar la posibilidad de utilizar estos dispositivos en concreto un *ex-situ* BiSPCE en estudios de complejación. Trabajos previos del grupo de investigación habían mostrado la capacidad de los BiFE en este tipo de estudios [168]. Concretamente en este trabajo, se consideró la complejación del Pb(II) con GSH y se realizaron valoraciones voltamperométricas utilizando DPV como técnica de medida. Para realizar estos estudios de complejación la formación de la película de bismuto debe realizarse vía *ex-situ* para evitar la competencia del Bi(III) con el metal de estudio en el proceso de complejación [168].

En los estudios de complejación de esta tesis doctoral se realizaron valoraciones voltamperométricas directas e inversas con un dispositivo *ex-situ* BiSPCE y los sistemas que se consideraron fueron el Cd(II)-GSH y el Cd-PC₂. Las valoraciones directas consisten en adicionar alícuotas de una solución de ligando, ya sea GSH o PC₂, a una solución de metal y en las valoraciones inversas se adiciona el metal a la solución de ligando. Los resultados de este estudio dieron lugar a una publicación (Talanta 107 (2013) 356-360 (Trabajo 3)).

Sistema Cd(II)-GSH

En las valoraciones directas del sistema Cd(II)-GSH se llevaron a cabo adiciones sucesivas de ligando sobre la solución de metal hasta un ratio GSH:Cd⁺² de 3:1 y en las inversas se realizaron adiciones sucesivas de metal hasta un ratio Cd⁺²:GSH de 2,25:1.

Los voltamperogramas obtenidos fueron ordenados en matrices de datos para poder ser trabajados quimiométricamente. Las matrices obtenidas contienen tantas filas como ratios se han considerado, y tantas columnas como potenciales se han registrado para cada voltamperograma.

En la Figura 1a y Figura 1b del Trabajo 3 se muestran los voltamperogramas obtenidos en las valoraciones directa e inversa, respectivamente, para el sistema Cd(II)-GSH. Las matrices que se muestran en esta figura corresponden a los voltamperogramas obtenidos, una vez los voltamperogramas originales se han tratado con diversos programas desarrollados por el grupo de investigación e implementados en Matlab, para

su suavizado y corrección de la línea de base. En la Figura 16 a) y c) se presentan los voltamperogramas originales (sin suavizar) de las valoraciones directa e inversa que como se puede ver son muy complejos.

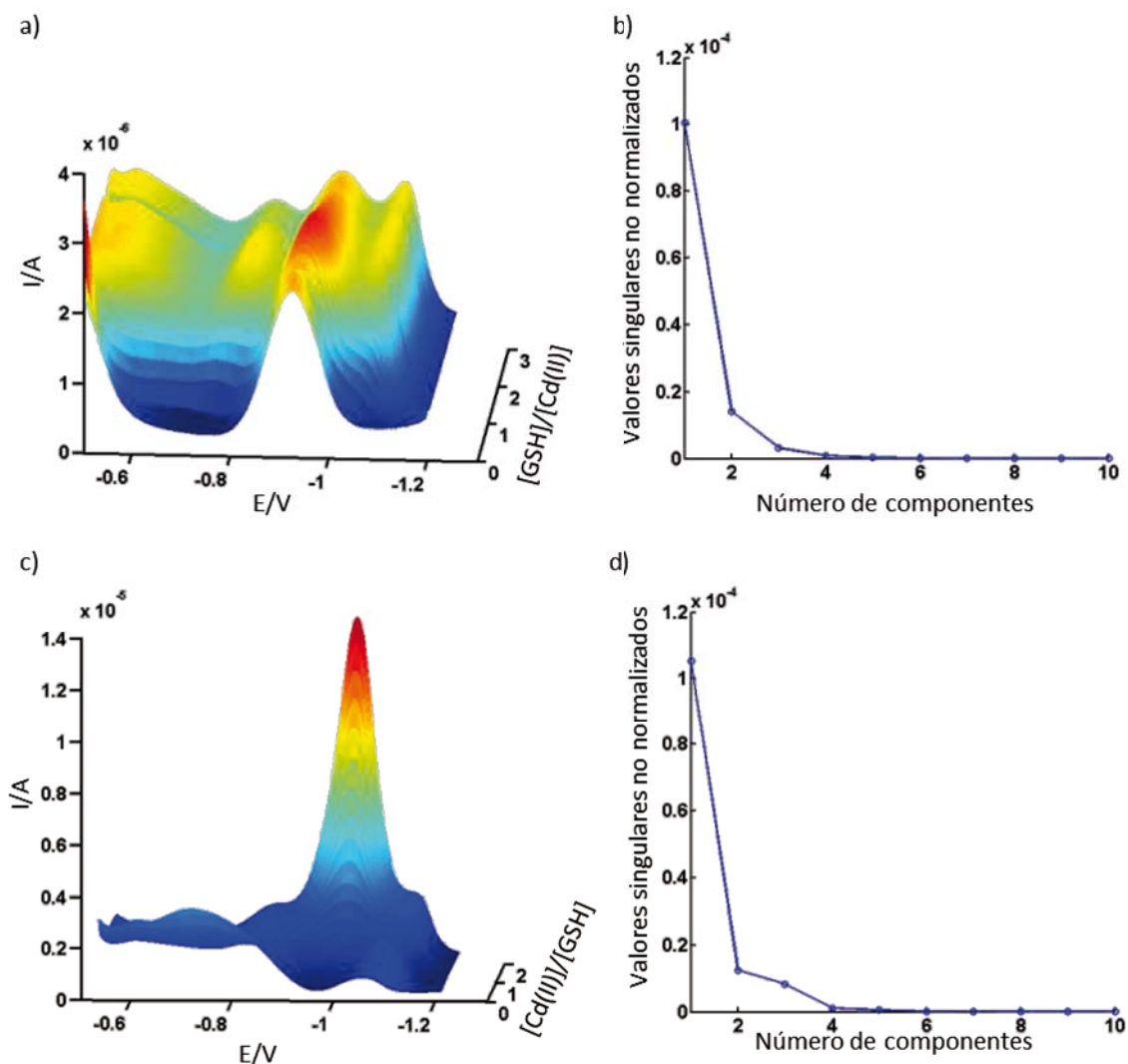


Figura 16. Sistema Cd(II)-GSH. Voltamperogramas originales sin suavizar de los datos de la matriz experimental a) valoración directa, y c) valoración inversa; y estimación del número de componentes (SVD) de las matriz I: b) valoración directa, y d) valoración inversa.

Una vez suavizados los datos y corregida la línea base, se realiza el tratamiento quimiométrico correspondiente para poder obtener información sobre el proceso de complejación; para ello se consideraron los métodos de MCR-ALS y GPA.

La inspección visual de las matrices de datos y la evolución de las señales a lo largo de la valoración permiten proponer un número de componentes tentativo que expliquen el comportamiento del sistema. En este punto recordar, tal como se ha dicho en la

introducción, que cada componente está relacionado con un proceso electroquímico y no necesariamente ha de corresponder a una especie química. Para ayudar a la selección del número de componentes se aplicó el método de descomposición de valores singulares (SVD) a las matrices de datos. Este tratamiento sugiere que el comportamiento de ambas matrices propone la presencia de 4 componentes (Figura 16 a y d respectivamente).

Teniendo en cuenta lo dicho anteriormente (concepto de componente en electroanálisis) y la evolución de los voltamperogramas a lo largo de la valoración se proponen los siguientes componentes para explicar el sistema Cd(II)-GSH: *i)* el componente relacionado con la señal anódica del material del electrodo, y asociado con el ligando libre; *ii)* componente 2, señal anódica pero esta vez relacionada con el complejo; *iii)* componente 3 relacionado con el proceso de reducción del metal libre; y *iv)* componentes 4 y 4' relacionados con los procesos de reducción de los complejos formados (reducción del enlace del metal). El componente 4' solamente se observa en la valoración directa, pudiendo estar asociado a un complejo débil de Cd(II)-GSH (ver la Figura 1 del Trabajo 3).

Dadas las características de la matriz de datos correspondientes a la valoración directa ésta nada más puede ser utilizada para obtener información cualitativa sobre el sistema, ya que el fuerte solapamiento de las señales no permite la aplicación ni del MCR-ALS ni del GPA. En ninguno de los casos se obtenían resultados razonables o el proceso no llegaba a converger.

La información más importante acerca del proceso de complejación fue la obtenida de la valoración inversa (Figura 1b del Trabajo 3). El análisis cualitativo de esta matriz de datos permite seguir la evolución del sistema de una manera bastante clara. Inicialmente, la solución de medida que nada más contiene GSH presenta un pico ancho atribuido a la señal anódica asociada al GSH y, que asociamos al componente 1 (ca. -0,73 V), la cual comienza a disminuir con la primera adición de cadmio, apareciendo a su vez un pico a ca. -1,07 V correspondiente a la formación del complejo Cd(II)-GSH, componente 4; después de varias adiciones de Cd(II), la señal anódica del GSH (componente 1) desaparece por completo y se observa la presencia de un pico a ca. -0,85 V (componente 2) que muestra un comportamiento similar al del complejo y que corresponde a la señal anódica del complejo; a ratios Cd(II)-GSH mayores de 0,5 se aprecia un nuevo pico intenso (ca. -1,01 V) correspondiente a la reducción del Cd(II)

libre (componente 3), al mismo tiempo la señal del complejo Cd(II)-GSH (componente 4) se estabiliza.

La evolución del sistema Cd(II)-GSH observada en este trabajo con el *ex-situ* BiSPCE es equivalente a la observada en trabajos previos usando electrodos de mercurio [169].

Los mejores resultados para el análisis de la matriz inversa se obtuvieron aplicando MCR-ALS a la matriz resultante de la valoración del GSH con el Cd(II). Los mejores resultados se obtienen (*lof* de 9,73%) considerando 4 componentes, y aplicando las restricciones de no negatividad (tanto para las concentraciones como para las señales), forma del pico para todos los componentes y selectividad para los componentes 2 y 4. En la Figura 2 del Trabajo 3 se pueden observar los voltamperogramas unitarios (a) y los perfiles de concentración (b) obtenidos.

A pesar de algunas ambigüedades, posiblemente debidas al fuerte solapamiento de las señales y al excesivo peso del pico del metal, el análisis de los perfiles de concentración confirmó el comportamiento cualitativo del sistema Cd(II)-GSH, comentado anteriormente y permitió proponer la formación del complejo 1:2 y del complejo 1:1 Cd:GSH. Estos resultados están en concordancia con los resultados obtenidos cuando se utiliza un electrodo de mercurio donde el modelo de complejación propuesto indicaba la formación de los complejos Cd(GSH)₂ y Cd₂(GSH)₂ [169]. Esta concordancia entre el BiSPCE y el electrodo de mercurio indica la posibilidad de usar este dispositivo más amigable con el medio ambiente para estudios de complejación.

Sistema Cd(II)-PC₂

Al igual que con el sistema anterior, la valoración directa proporcionó únicamente información cualitativa acerca del comportamiento del sistema. En la Figura 17a y Figura 17b se presentan los voltamperogramas originales sin suavizar y las gráficas correspondientes a la aplicación de SVD a los datos experimentales.

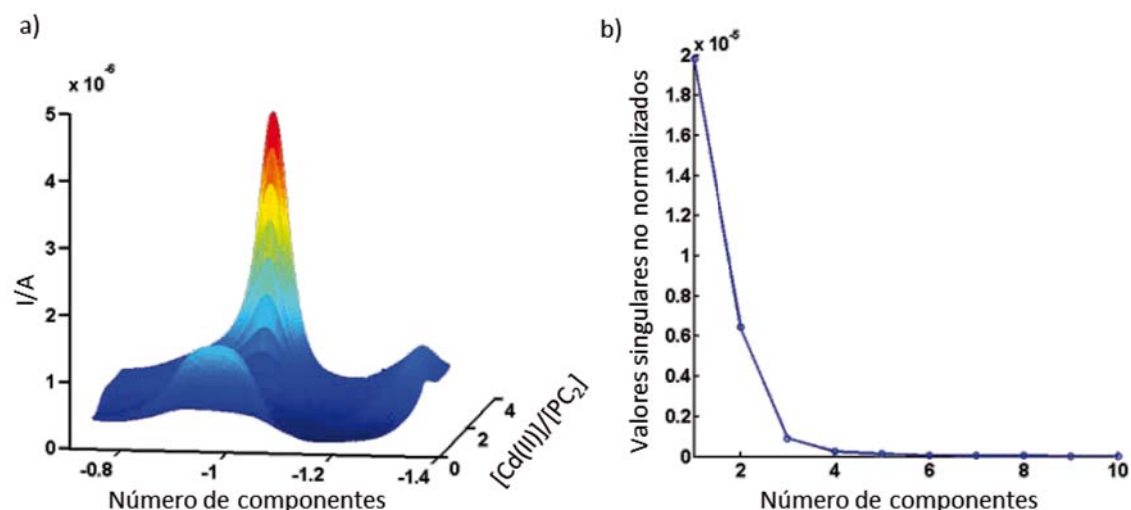


Figura 17. Valoración inversa de sistema Cd(II)-PC₂: a) voltamperogramas originales sin suavizar de los datos de la matriz experimental; y b) estimación del número de componentes (SVD) de las matriz I.

Para obtener una información más completa del proceso de complejación se consideró la matriz correspondiente a la valoración inversa (Figura 3 del Trabajo 3). La aplicación del SVD a los datos obtenidos sugiere la existencia de 4 componentes, aunque finalmente el comportamiento del sistema se explica muy bien con 3 componentes. Al inicio de la valoración se observa un pico ancho (componente 1) a ca. -0,98 V que está asociado con la señal anódica del material del electrodo y su interacción con la PC₂. Después de varias adiciones de Cd(II), el pico del componente 1 va disminuyendo y, simultáneamente, aparece un nuevo pico (componente 3) a ca. -1,30 V que va aumentando de altura al avanzar la valoración. Este pico (componente 3) está relacionado con el complejo entre Cd(II) y la PC₂. Finalmente, cuando la señal asociada con el ligando libre ha desaparecido por completo a ca. -1,03 V aparece el pico, relacionado con la reducción del ion metálico libre (componente 2) y va creciendo con la adición del metal.

Al aplicar los diferentes tratamientos quimiométricos a los datos obtenidos en la valoración inversa, se vio que al igual que para el sistema anterior, los mejores resultados se obtenían al aplicar MCR-ALS. Pero en este caso, si el tratamiento se hacía siguiendo las mismas pautas que en el sistema anterior no se alcanza la convergencia, ni considerando tres componentes (señal anódica del ligando, la señal del metal libre y la señal de complejo) ni cuatro (señal anódica del ligando, la señal del metal libre y la señal de complejo y su correspondiente señal anódica). Por lo que se optó por añadir un componente adicional relacionado con la línea de base. En estas condiciones el

tratamiento proporciona resultados satisfactorios con una falta de ajuste de 10,92%. La adición de este componente, que no tiene una forma de pico, es útil para corregir la distorsión de la línea base original y se puede justificar después de un análisis cuidadoso de la matriz de datos. En este tratamiento se aplicaron las restricciones de no negatividad para la concentración y los voltamperogramas; forma de pico para todos los componentes, excepto el componente asociado con la línea base; y selectividad para los componentes 1 y 2. Los voltamperogramas unitarios y el perfil de concentración proporcionados por MCR-ALS se muestran en la Figura 3 del Trabajo 3.

El análisis de los perfiles de concentración permitió proponer la formación de un complejo 1:2 $\text{Cd}^{2+}:\text{PC}_2$. No obstante el análisis más detallado del perfil muestra que el componente 2 no aparece hasta un ratio $\text{Cd}^{2+}:\text{PC}_2$ próximo a 1, lo que podría indicar la formación de un complejo $\text{Cd}^{2+}:\text{PC}_2$ 1:1 o 2:2 cuya señal no fuese visible. Este hecho inusual podría explicarse por la forma complicada de los voltamperogramas, que requieren de la introducción del componente de línea base en el tratamiento MCR-ALS. Esta línea de base podría ocultar una señal muy pequeña o muy ancha de un posible complejo 1:1. Si se comparan los resultados obtenidos para ambos sistemas, Cd(II)-GSH y el Cd(II)-PC_2 , se puede ver que la señal anódica relacionada con la PC_2 libre (componente 1) y la señal del complejo Cd(II)-PC_2 (componente 3) aparecen a potenciales más negativos que las correspondientes para el sistema Cd(II)-GSH ; esto se debe a la mayor estabilidad del enlace metal ligando en el caso de la PC_2 en comparación con el GSH. En general, cuanto más negativo es el potencial de la señal de reducción del complejo, más fuerte es el enlace metal-ligando.

Los resultados de este trabajo muestran las posibilidades de los BiSPCE en estudios de complejación aunque habría que indicar que la información obtenida con estos dispositivos no es tan clara como la obtenida con los HMDE [169].

10. Aplicación de un electrodo serigrafiado de carbono modificado con antimonio a la determinación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en muestras naturales con DPASV

A pesar que el bismuto ha demostrado con éxito ser un material alternativo al mercurio, cuando se utiliza un BiSPCE modificado vía *ex-situ* presenta problemas en la determinación de iones con un potencial estándar más positivo que el del bismuto. Por otro lado, se han observado algunas limitaciones en la determinación de Cu(II) cuando se usa un *in-situ* BiFE debido a la competencia del cobre y el bismuto por electrodepositarse en la superficie del electrodo [42]. Así pues, la búsqueda de materiales alternativos al mercurio sigue siendo un tema de gran interés. El antimonio que presenta algunas características favorables como son su posible uso en medios muy ácidos (pH 2 o inferiores) y sus bajas señales de fondo en la zona del límite del potencial anódico, muestra además una señal muy baja de reoxidación del antimonio comparada con la señal de los electrodos de bismuto o de mercurio. Esta característica del electrodo de antimonio permitiría la determinación de otros analitos de interés con potenciales de redisolución cercanos al potencial de reoxidación del antimonio, como el Cu(II), Hg(II) y Bi(III).

Así pues, se consideró interesante estudiar la aplicabilidad del electrodo de antimonio en la determinación de metales como Cd(II), Pb(II) y Cu(II). En este estudio al igual que en el Trabajo 1, se realizó la caracterización morfológica de los electrodos de antimonio preparados vía *in-situ*, *ex-situ*, y de un electrodo comercial obtenido vía sputtering.

Como en el caso de los BiSPEs, se llevó a cabo un estudio sistemático, optimizando en primer lugar los parámetros para la correcta elaboración de las películas de antimonio sobre la superficie de carbono vía *ex-situ* e *in-situ*, la caracterización analítica de los dispositivos y su aplicación para la determinación Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en un agua subterránea certificada.

10.1. Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples

Velia Sosa, Cristian Barceló, Núria Serrano, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Analytica Chimica Acta 855 (2015) 34–40



Antimony film screen-printed carbon electrode for stripping analysis of Cd(II), Pb(II), and Cu(II) in natural samples



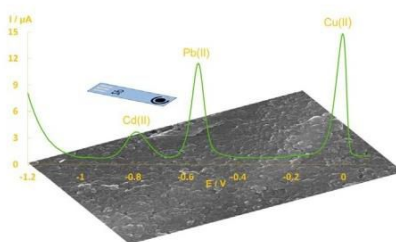
Velia Sosa, Cristian Barceló, Núria Serrano, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028, Barcelona, Spain

HIGHLIGHTS

- *In-situ* SbSPCEs are used for the determination of Cu(II), Cd(II) and Pb(II) ions.
- Sb electrode is proposed as an alternative to *in-situ* bismuth film electrodes.
- LOD and LOQ at $\mu\text{g L}^{-1}$ levels allow the considered ions determination in natural samples.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 October 2014

Received in revised form 4 December 2014

Accepted 8 December 2014

Available online 10 December 2014

Keywords:

Antimony film electrodes
Screen-printed electrodes
Stripping voltammetry
Metal ions

ABSTRACT

An *in-situ* antimony film screen-printed carbon electrode (*in-situ* SbSPCE) was successfully used for the determination of Cu(II) simultaneously with Cd(II) and Pb(II) ions, by means of differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV), in a certified reference groundwater sample with a very high reproducibility and good trueness. This electrode is proposed as a valuable alternative to *in-situ* bismuth film electrodes, since no competition between the electrodeposited copper and antimony for surface sites was noticed. *In-situ* SbSPCE was microscopically characterized and experimental parameters such as deposition potential, accumulation time and pH were optimized. The best voltammetric response for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) ions was achieved when deposition potential was -1.2 V , accumulation time 120 s and pH 4.5. The detection and quantification limits at levels of $\mu\text{g L}^{-1}$ suggest that the *in-situ* SbSPCE could be fully suitable for the determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) ions in natural samples.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mercury was used as an electrode material for a long time due to their wide cathodic range. Nevertheless, due to the potentially toxicity of mercury vapors and mercury salts, the research of alternative materials is an area of major concern [1]. In 2000 bismuth film electrodes (BiFE) were introduced as substitutes of mercury electrodes demonstrating their applicability

for electroanalytical purposes [2]. However, some limitations for the determination of Cu(II) were observed using *in-situ* bismuth film electrodes due to the competition of the electrodeposited copper and the bismuth for surface sites [2]. Thus, the presence of Cu(II) interferes on the determination of Pb(II) and Cd(II) decreasing the sensitivity of the bismuth film electrode validating the theory of competition between Cu(II) and Bi(III) ions [3].

With the aim of developing new electrode materials, in 2007, antimony film electrodes (SbFE) were considered for metal ions determination [4,5]. The principal advantages of the SbFE in comparison to the BiFE were the wider useful potential window, and its performance at more acidic media [6]. The general

* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: 34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina.arino@ub.edu (C. Ariño).

Sb-coating methods are similar to those used for the preparation of BiFEs: (i) *in-situ* plating method – the electrode is immersed directly into the sample solution containing Sb(III) ions and antimony is electrochemically deposited on the electrode surface during the analysis [4,6–8]; (ii) *ex-situ* plating or preplated method – the electrode is immersed into a Sb(III) solution and, after the application of an appropriate potential, Sb(III) ions are reduced to metallic Sb and electroplated on the electrode surface; later, the SbFE is rinsed carefully with ultra-pure water and then immersed into the sample solution [9,10]; (iii) the “bulk” method – the modification with Sb takes place during the preparation of the electrode and involves the preparation of a mixture of carbon paste and antimony precursor (Sb_2O_3); Sb precursor is later electrochemically reduced to metallic Sb at a selected potential [11]; and (iv) the sputtering method – the thin film of antimony is obtained by the antimony sputtering on a silicon substrate [12].

Glassy carbon and carbon paste are the substrates most commonly used for SbFE. Additionally, gold and platinum disk electrode as well as boron doped diamond (BDD) [13] were also used. Nevertheless, the carbon substrates provided better results than Au and Pt substrates [6].

On the other hand, screen printed technology is a renowned method for the fabrication of sensors and biosensors. Screen-printed electrodes (SPEs) usually include a three electrode configuration (working, counter and reference electrodes) printed on the same strip [14]. Moreover, screen-printed devices present the advantage that they do not need to be polished as the typical glassy carbon electrodes, or be prepared as the carbon paste electrodes. SPEs are well known for their low-cost commercial availability, miniaturized size, and the possibility of connecting them to portable instrumentation. Bismuth screen-printed electrodes (BiSPEs) were successfully used for the determination of different metal ions [13–16] as well as for complexation studies [17].

Studies devoted to the application of Sb electrodes for the simultaneous determination of Cu(II) with others metals ions such as Cd(II) and Pb(II), or the single determination of Cu(II) are really scarce [18,19]. A tentative study using an antimony film microelectrode (SbFME) for the determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) [18] was carried out and, although the simultaneous determination of the three metals was not successfully achieved, it demonstrated the possibilities of Sb electrodes for the determination of Cu(II). Regarding the applicability of antimony screen printed electrodes (SbSPE) for the analysis of metal ions, only few studies are published using modified SbSPE for the determination of Pb(II) [20,21], for the determination of Hg(II) [21], and for the simultaneous determination of Cd(II) and Pb(II) [22]. Nevertheless, the applicability of an *in-situ* antimony screen-printed carbon electrode (*in-situ* SbSPCE) for the single determination of Cu(II) or for the simultaneous determination of this metal ion with other metal ions such as Cd(II) and Pb(II) was not investigated yet.

Thus, in the present work, an *in-situ* antimony electrode obtained from the modification of a commercial screen printed carbon electrode (*in-situ* SbSPCE) were microscopically and analytically studied for the determination of Pb(II), Cd(II) and Cu(II) using differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV). Moreover, *in-situ* SbSPCE were applied for the first time for the simultaneous monitorization of Pb(II), Cd(II) and Cu(II) ions in a certified groundwater sample.

2. Experimental

2.1. Chemicals

A Sb(III) 1000 mg L⁻¹ atomic absorption standard solution was purchased from Merck. Certified reference material, groundwater (BCR[®]-610), and ultrapure potassium nitrate were purchased from

Sigma–Aldrich. All other reagents used were Merck or Fluka analytical grade. Daily standard solutions of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) were prepared by appropriate dilution of stock solutions 10⁻² mol L⁻¹, prepared from Cd(NO₃)₂·4H₂O, Pb(NO₃)₂·4H₂O and Cu(NO₃)₂·3H₂O respectively, and standardized complexometrically. 0.01 mol L⁻¹ solutions of hydrochloric acid (pH 2.0), maleic acid/maleate buffer solution (pH 6.8) and acetate buffer solution (pH 4.5) were used for pH control. 0.01 mol L⁻¹ KNO₃ was employed as supporting electrolyte. Ultrapure water (Milli-Q plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

2.2. Apparatus

Differential pulse anodic stripping voltammetric (DPASV) measurements were performed in an Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie, The Netherlands) attached to a Metrohm 663 VA Stand (Metrohm, Switzerland) and a personal computer with GPES version 4.9 data acquisition software (EcoChemie).

The reference electrode (to which all potentials are referred) and the auxiliary electrode were Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹) and Pt wire, respectively.

In all the experiments, the working electrode used was an *in-situ* SbSPCE prepared from a commercial screen-printed carbon disk electrode of 4 mm of diameter (ref. DRP-110, DS SPE) provided by DropSens (Spain).

All measurements were carried out in a glass cell at room temperature (20 °C) under a purified nitrogen atmosphere (Linde N50).

Unless otherwise indicated, a pulse time of 40 ms, step potential of 2 mV, and pulse amplitude of 50 mV were applied in the stripping step. The optimized deposition potential (E_d) was applied with stirring during the optimized accumulation time (t_{acc}), and a rest period (t_r) of 30 s was maintained between deposition and stripping step.

The surface morphology characterization was carried out by a scanning electron microscope JSM 7100FE from JEOL (Japan).

2.3. Experimental procedure

2.3.1. In-situ preparation of SbSPCE

For the antimony *in-situ* modification of SPCE, a 0.5 mg L⁻¹ Sb(III) ion solution was directly added to the sample solution and electrochemically deposited with the target metal ions (cadmium, lead and cooper) on the electrode surface during the analysis.

2.3.2. Procedure

The linear calibration plots for the simultaneous determination on an *in-situ* SbSPCE by DPASV of Pb(II) and Cu(II), and of Pb(II), Cd (II) and Cu(II), at E_d of -0.7 V and -1.20 V respectively, were obtained increasing metal concentrations at pH 4.5 acetate buffer and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength.

In the analysis of the certified groundwater sample, voltammetric analysis started by placing in the cell a volume of the sample (BCR[®]-610) in 0.01 mol L⁻¹ acetate buffer (pH 4.5) and 0.01 mol L⁻¹ KNO₃. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 15 min, to avoid the effect of oxygen in voltammetric measurements, and the voltammetric scan was recorded. In the case of calibration by standard addition, four aliquots of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) standard solutions, applying a E_d of -1.2 V, and five aliquots of Pb(II) and Cu(II) standard solutions, applying a E_d of -0.7 V, were further added and the respective curves were recorded. All solutions were deaerated and mechanically stirred for 30 s after each standard addition. In order to prevent changes in ionic strength, the solutions to be added contained 0.01 mol L⁻¹ KNO₃.

In both, linear calibration plots and analysis of the certified groundwater sample, before each measurement a cleaning

step was performed by keeping the working electrode at +0.5 V for 15 s.

3. Results and discussion

3.1. Morphological surface characterization: SEM analysis

Fig. 1 compares the SEM images obtained at $5000\times$ magnifications of a bare SPCE and different Sb-coated SPEs. The scanning electron micrograph of a typical (commercial) bare SPCE (Fig. 1A) exhibits a uniform carbon surface in comparison with the other SbSPE surfaces (Fig. 1B–D). Fig. 1B and C corresponds to SEM images of *in-situ* and *ex-situ* SbSPCE respectively, in which the deposited Sb can be observed. In both, *in-situ* and *ex-situ* SbSPCE, the Sb film was formed by firmly fixed Sb, although Sb (particularly in the *ex-situ* SbSPCE) does not cover the entire carbon surface. Moreover, the *ex-situ* SbSPCE surface is different from that of the *in-situ* SbSPCE, the Sb particles in the *ex-situ* one are bigger, brighter and more randomly dispersed than those observed on the *in-situ* SbSPCE surface.

The surface morphology of Sb_{sputtered} SPE looks different from the rest of SbSPE (Fig. 1D). The Sb particles have different sizes, and are bigger and more compact than those observed on the *ex-situ* SbSPCE micrograph. The main differences are that the substrate of this electrode is ceramic instead of carbon and that antimony was sputtered directly on it.

The comparison of the SEM micrographs show that both the Sb-coating method and the type of substrate greatly affect the

shape, size and distribution of Sb particles deposited on the electrode surface.

Given the better morphological features of the *in situ* protocol on the carbon screen-printed support together with the fact that the *in situ* plating simplifies and shortens the experimental procedure (as no separate antimony-plating step is required), this was used for all further experiments.

3.2. Optimization of electrochemical parameters and condition media for the *in-situ* SbSPCE

The effect of deposition potential, accumulation potential and pH of the medium in the voltammetric response of the *in-situ* SbSPCE for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) was investigated.

3.2.1. Effect of the deposition potential

As a significant parameter in the preconcentration of metal ions in stripping analysis, the effect of the deposition potential was investigated (Fig. 2). Stripping voltammetric measurements of a solution containing $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ of metal ion solution were carried out using deposition potentials (E_d) of -0.5 V , -0.7 V and -1.2 V in 0.01 mol L^{-1} acetate buffer solution (pH 4.5) and applying an accumulation time (t_{acc}) of 120 s.

At E_d of -0.5 V (Fig. 2, thin line) only a badly shaped peak of Cu(II) is observed, at ca. -0.02 V , which is strongly overlapped with the Sb(III) signal. Applying a E_d of -0.7 V (Fig. 2, dotted line) peaks related to Pb(II) and Cu(II), at ca. -0.58 V and ca. -0.02 V

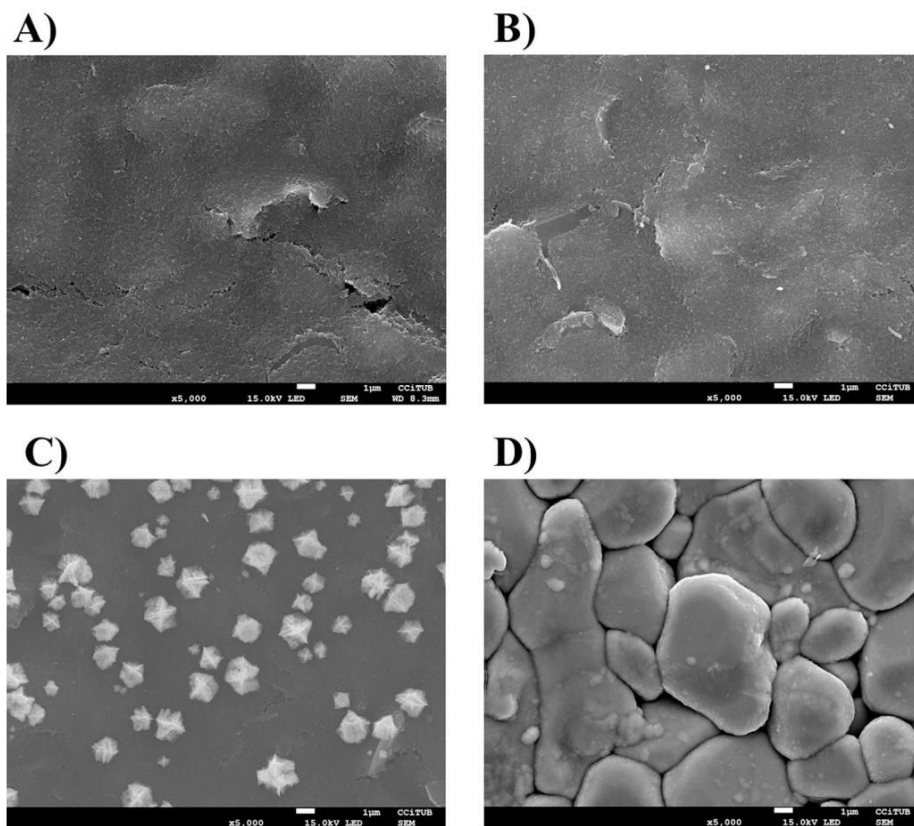


Fig. 1. Scanning electron micrographs: (A) commercial screen printed carbon electrode (SPCE); (B) antimony film coated *in-situ* on a commercial SPCE; (C) antimony film coated *ex-situ* on a commercial SPCE; (D) commercial antimony sputtered screen-printed electrode. Resolution of $1 \mu\text{m}$, magnification of $5000\times$ and accelerating potential of 15.0 kV were used.

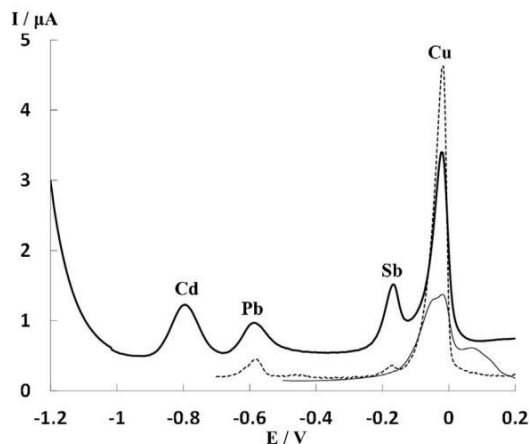


Fig. 2. Deposition potential effects observed measuring a solution $5 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) by DPASV on an *in-situ* SbSPCE applying an E_d of -0.5 V (thin line), -0.7 V (dotted line) and -1.2 V (thick line) during a t_{acc} of 120 s at acetate buffer (pH 4.5) and $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$.

respectively, are clearly noticed. Both peaks are well defined, nevertheless a minimum overlapping between Cu(II) and Sb(III) peaks (close to -0.16 V) is appreciated. Finally, at E_d of -1.2 V , peaks of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) ions, are obtained (Fig. 2, thick line), exhibiting very well shaped peaks for Cd(II) and Pb(II), at ca. -0.78 V and -0.58 V respectively, and a defined Cu(II) peak, at ca. -0.02 V , which is slightly overlapped with the Sb(III) peak at ca. -0.16 V .

From the voltammograms shown in Fig. 2, it can be concluded that using an *in-situ* SbSPCE the simultaneous determination of Pb(II) and Cu(II) can be successfully carried out at E_d of -0.7 V , whereas the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) is achieved applying an E_d of -1.2 V .

3.2.2. Effect of the accumulation time

DPASV measurements of a $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ metal ion solution, in 0.01 mol L^{-1} acetate buffer solution pH 4.5, were carried out at different t_{acc} ranging from 30 to 180 s and applying an E_d of -1.2 V (data not shown). Non-very well defined peaks were observed at t_{acc} of 30–60 s, while at t_{acc} of 90–180 s very well defined peaks were obtained for all metal ions that, as expected for stripping voltammetry, increase proportionally to the t_{acc} . According to this study, an optimal t_{acc} of 120 s was selected.

3.2.3. Effect of pH

The optimization of the pH for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) by DPASV on the *in-situ* SbSPCE was carried out increasing the metal concentration from 1.0×10^{-7} to $2.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ and applying an E_d of -1.2 V and t_{acc} of 120 s at three different pH values: hydrochloric acid (pH 2.0), acetate buffer solution (pH 4.5) and maleic acid/maleate buffer solution (pH 6.8) (Fig. 3).

The voltammetric responses are significantly different. At hydrochloric acid (pH 2.0) (Fig. 3A) only Pb(II) exhibits, at ca. -0.51 V , an unique and undistorted peak, which increases proportionality with the metal concentration; whereas Cd(II) peak, at ca. -0.79 V , is very small and practically independent on the metal concentration. Regarding Cu(II) ion, it presents a peak, at ca. 0.21 V , which appears strongly overlapped with the Sb(III) peak. A better performance was observed at acetate buffer solution (pH 4.5) (Fig. 3B) where the peaks related to Cd(II), Pb(II) and Cu(II) ions, at ca. -0.79 V , -0.51 V and 0 V respectively,

are well defined and evolve with metal concentrations, as it can be expected. In addition, at pH 4.5, the obtained Cu(II) peak is practically non-overlapping with the Sb(III) peak. Finally, at maleic acid/maleate buffer solution (pH 6.8) (Fig. 3C) a relatively well defined Cu(II) peak, at ca. -0.11 V , completely separated from the Sb(III) one was detected, but neither signals due to Cd(II) nor Pb(II) ions were observed. At this pH value, the Cu(II) peak increases as expected with the metal concentration, but the values of the peak currents are lower than those observed at pH 4.5. Thus, the obtained voltammograms show that this pH value drastically affects the reoxidation of metal ions, probably due to the presence of some metal hydrolysis and/or the possible complexation with the buffer system.

From these results it can be concluded that the most favorable pH value for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) on *in-situ* SbSPCE is pH 4.5. For all further experiments, a pH 4.5 was considered for metal determination.

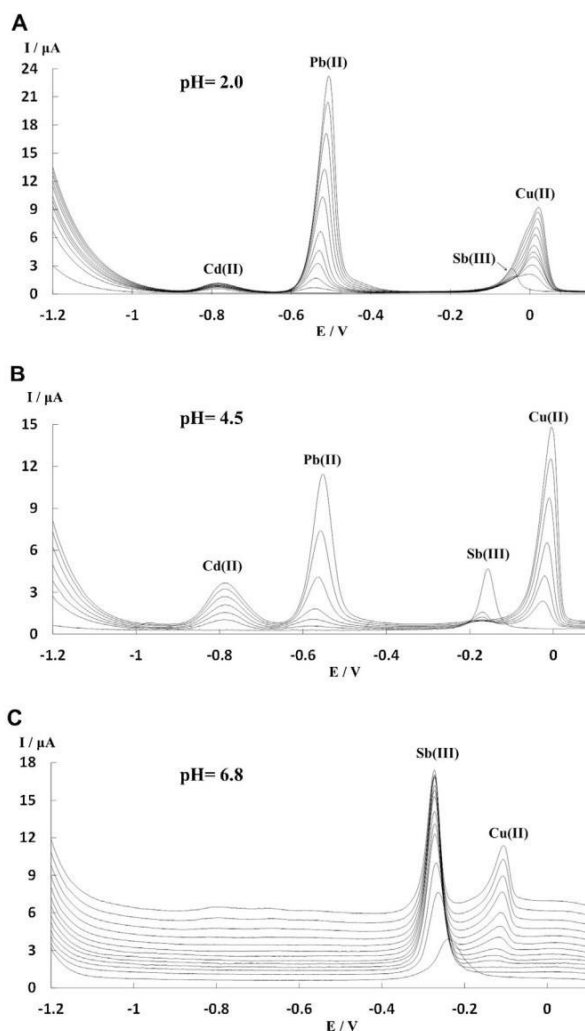


Fig. 3. DPASV measurements at increasing concentrations of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) on an *in-situ* SbSPCE using an E_d of -1.2 V during a t_{acc} of 120 s and $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ at the three evaluated pHs: (A) hydrochloric acid (pH 2.0), (B) acetate buffer solution (pH 4.5), and (C) maleic acid/maleate buffer solution (pH 6.8).

Table 1

Calibration data for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II), and Pb(II) and Cu(II) at E_d of -1.2 V and E_d of -0.7 V respectively on *in-situ* SbSPCE using a t_{acc} of 120 s at pH 4.5 and 0.01 mol L^{-1} ionic strength.

E_d	-1.2 V			-0.7 V	
Metals	Cd(II)	Pb(II)	Cu(II)	Pb(II)	Cu(II)
Regression ^a	$y = 0.66x - 4.37$	$y = 0.23x - 4.35$	$y = 5.61x - 29.95$	$y = 0.75x - 14.78$	$y = 7.61x - 0.57$
R^2	0.995	0.994	0.999	0.995	0.999
Linear range ($\mu\text{g L}^{-1}$) ^b	11.5–72.4	16.8–62.6	5.3–99.8	16.1–55.5	0.95–54.8
LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	3.4	5.0	1.6	4.8	0.28

^a y is the peak area (a.u.) and x the concentration ($\mu\text{g L}^{-1}$).

^b The lowest value of the linear range was considered from the LOQ.

3.3. Calibration data

As it was explained in Section 3.2.1, an E_d of -0.7 V, for the simultaneous determination of Pb(II) and Cu(II), and an

E_d of -1.2 V, for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II), were considered for the evaluation of linearity, limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) (Table 1).

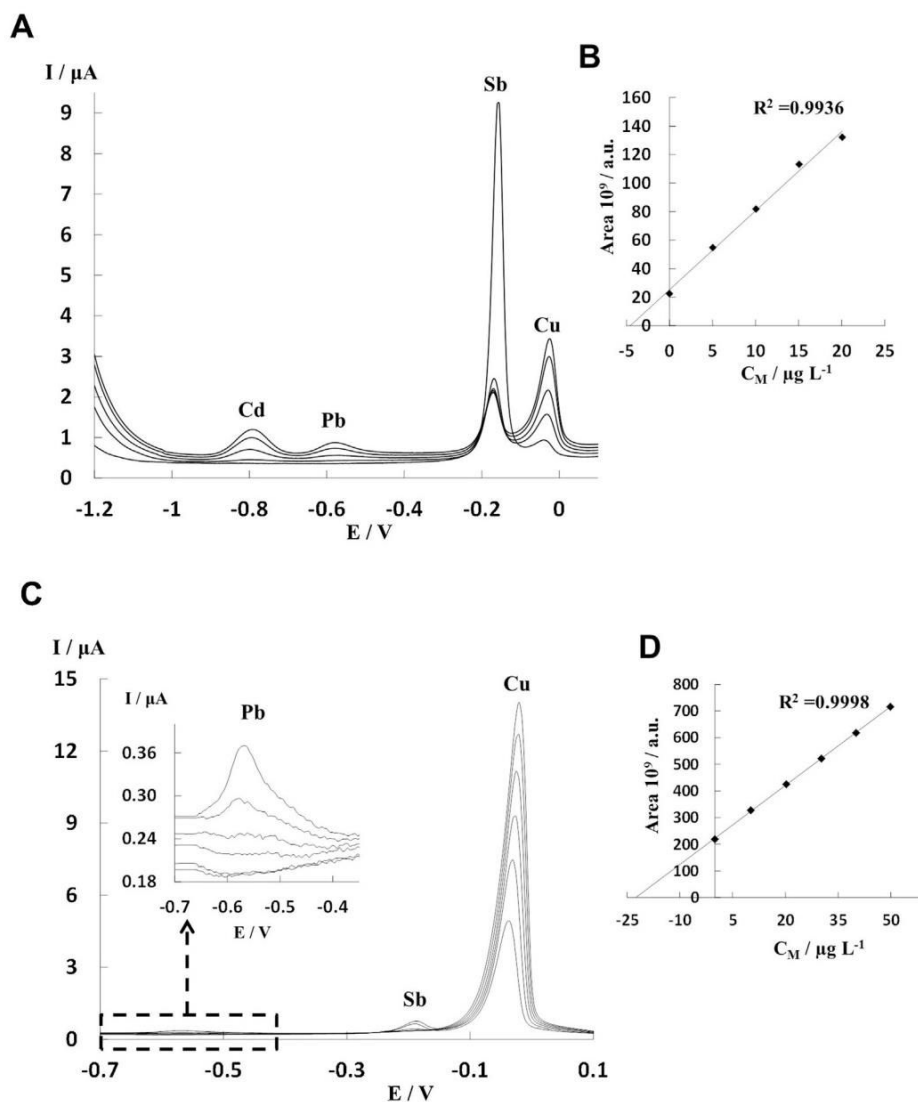


Fig. 4. DPASV measurements in groundwater samples on an *in-situ* SbSPCE at pH 4.5 and 0.01 mol L^{-1} ionic strength using a t_{acc} of 120 s at (A) E_d of -1.2 V and (C) E_d of -0.7 V; and Cu(II) standard addition plots at (B) E_d of -1.2 V and (D) E_d of -0.7 V.

Table 2

Total concentrations of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) determined in certified groundwater (BCR[®]-610) by DPASV on *in-situ* SbSPCE by standard addition calibration method applying a t_{acc} of 120 s at pH 4.5 and 0.01 mol L⁻¹ ionic strength.

E_d	Copper ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Relative error (%)	Cadmium ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)	Lead ($\mu\text{g L}^{-1}$)	RSD (%)
-1.2	43.8	3.8	4.3	n.d.	–	n.q	–
-0.7	45.2	0.4	1.1	–	–	n.q	–
Certified metal value	45.7	3.3	–	2.94	2.7	7.78	1.7

$n = 3$ for RSD (%); n.d.: not detected; n.q.: not quantified.

The lowest values of the linear concentration ranges were established from the corresponding LOQs, which were calculated as 10 times the standard deviation of the intercept over the slope of the calibration curve of the target ions. LODs were evaluated by considering 3 times the previous relation. For LOD and LOQ determinations, ten standard solutions of Pb(II) and Cu(II) and thirteen standard solutions of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) were used as calibration samples. In all cases, well defined stripping peaks were obtained (data not shown).

Excellent linear responses of peak area *versus* metal ion concentrations were obtained using the *in-situ* SbSPCE for all metals in both studies. As shown in Table 1, both LOD and LOQ were at the level of $\mu\text{g L}^{-1}$ for all metal ions. For Pb(II), LOD and LOQ are independent of the deposition potentials; for Cu(II) are slightly lower at $E_d = -0.7\text{ V}$; and for Cd(II) and Pb(II), the LODs are slightly higher than those reported in the literature for Sb electrodes [5,18]. In contrast, for Cu(II), the LOD obtained in the simultaneous calibration with Cd(II) and Pb(II), applying an E_d of -1.2 V , is comparable to that previously reported for the individual determination of Cu(II) using Sb electrodes [18,19]. However, a lower LOD was achieved at $E_d = -0.7\text{ V}$ [4,18,19]. Moreover, the Cu(II) LODs obtained in this work for *in-situ* SbSPCE are significantly lower than those provided by an *in-situ* bismuth screen-printed electrodes (*in-situ* BiSPCE) (Table 2 in [14]). Therefore the reported calibration data suggest that the *in-situ* SbSPCE could be fully suitable for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) at trace levels in natural samples without signs of competition of the electrodeposited copper and antimony for surface sites. Moreover, the screen-printed carbon electrodes are commercially available and do not need any previous treatment as polishing of the electrode or the previous preparation of the film.

3.4. Application to the analysis of a groundwater reference material

A groundwater certified reference material (BCR[®]-610) was selected to study the suitability of the *in-situ* SbSPCE for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II), as an example of its applicability for the analysis of natural samples. Metal ions determination was carried out by means of the standard addition method. Then, voltammetric stripping measurements at the optimized conditions described above were performed including the additions of Pb(II) and Cu(II) at $E_d = -0.7\text{ V}$, and Cd(II), Pb(II) and Cu(II) at $E_d = -1.2\text{ V}$. It should be mentioned that the same device was used for the DPASV measurements of a complete analysis. Fig. 4A and C shows representative DP voltammograms obtained in the analysis of the groundwater samples on an *in-situ* SbSPCE at both $E_d = -1.2\text{ V}$ and -0.7 V respectively. Cd(II), Pb(II) and Cu(II) peaks behave in the same way as in the calibration data: well defined peaks for the three metal ions were obtained applying a E_d of -1.2 V , and only a slightly overlapping between Cu(II) and Sb(III) peaks is exhibited (Fig. 4A). At E_d of -0.7 V , regular stripping Pb(II) peak, showed as an inset, and an undistorted Cu(II) peak are observed in Fig. 4C.

Standard addition plots for Cu(II) (Fig. 4B and D) shows the good correlation of the measurements carried out applying an E_d of -1.2 V and -0.7 V respectively. It should be mentioned that the

Cd(II) and Pb(II) standard addition plots are not provided: the concentration of Pb(II) is below the LOQ while that of Cd(II) below the LOD.

The Cu(II) concentrations of three replicates of the certified groundwater obtained by DPASV at E_d of -1.2 V and -0.7 V are reported in Table 2. A good concordance between Cu(II) concentrations were obtained for both E_d , as well as with the certified Cu(II) value. The relative standard deviation (RSD %) and the relative error (%) were higher at E_d of -1.2 V than at E_d of -0.7 V probably due to the fact that, even small overlapping between the Cu(II) and Sb(III) peaks at E_d of -1.2 V , hinders the precise measurement of the peaks. Nevertheless, these good results confirm the applicability of the *in-situ* SbSPCE for the determination of low levels concentrations of Cu(II) simultaneously with Cd(II) and Pb(II) ions in environmental samples.

4. Conclusions

An *in-situ* SbSPCE was proposed as an alternative to *in-situ* BiFE for the simultaneous determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) ions in natural samples. Firstly, microscopic features of an *in-situ* SbSPCE were compared with those of other SbSPCEs, and the electrochemical parameters for the detection of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) by DPASV using the *in-situ* approach were optimized. The best voltammetric response was achieved using a E_d of -0.7 V and -1.2 V for the simultaneous detection of Pb(II) and Cu(II) and Cd(II), Pb(II) and Cu(II) respectively. *In-situ* SbSPCE provides well-shaped stripping peaks for Cd(II), Pb(II) and Cu(II) at E_d of both -0.7 V and -1.2 V , although a slightly overlapping between Cu(II) and Sb(III) peaks is appreciated at E_d of -1.2 V . The obtained LODs and LOQs were at levels of $\mu\text{g L}^{-1}$ for all metals. Particularly for Cu(II), similar or even slightly lower values were reported as compared to previous studies for Sb electrodes. At the view of the results, it can be concluded that *in-situ* SbSPCE constitutes a good alternative to *in-situ* BiSPCE for the determination of Cu(II) simultaneously with Cd(II) and Pb(II) ions. The obtained Cu(II) LODs are not only significantly lower but also no competition of the electrodeposited copper and antimony for surface sites was detected. As in the case of the BiSPCEs, the low toxicity, the disposable character, the good reproducibility, the homogeneous surface morphology and the low-cost commercial availability of SPCE makes it attractive for environmental applications. Furthermore, the proposed electrode can be used for a large set of measurements without signs of degradation or loss of sensitivity.

Under the above optimized conditions, the determination of Cd(II), Pb(II) and Cu(II) in a natural sample on *in-situ* SbSPCE was successfully carried out being able to quantify the Cu(II) concentration with very high reproducibility and good trueness inferred by the relative standard deviation (0.4% and 3.8% at E_d of -0.7 V and -1.2 V respectively) and the relative error (1.1% and 4.3% at E_d of -0.7 V and -1.2 V respectively) respectively. Regarding Pb(II), its detection was possible but not its quantification either applying an $E_d = -1.2\text{ V}$ or -0.7 V since its concentration in the groundwater sample was below the obtained LOQ, whereas Cd(II) could not even be detected because its concentration was lower than the obtained LOD.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2012-32863). Velia Sosa Gómez is grateful to Fundación Carolina for her Ph.D. grant.

References

- [1] C. Kokkinos, I. Raptis, A. Economou, T. Spiliotis, Determination of trace Tl(I) by anodic stripping voltammetry on novel disposable microfabricated bismuth-film sensors, *Electroanalysis* 22 (2010) 2359–2365.
- [2] J. Wang, J. Lu, Ü.A. Kirgöz, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 29–34.
- [3] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, Investigation of copper(II) interference on the anodic stripping voltammetry of lead(II) and cadmium(II) at bismuth film electrode, *Electroanalysis* 25 (2013) 2637–2644.
- [4] A. Bobrowski, M. Putek, J. Zarebski, Antimony film electrode prepared in situ in hydrogen potassium tartrate in anodic stripping voltammetric trace detection of Cd(II), Pb(II) Zn(II), Tl(I), In(III) and Cu(II), *Electroanalysis* 24 (2012) 1071–1078.
- [5] S.B. Hocevar, I. Svancara, B. Ogorevc, K. Vytras, Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis, *Anal. Chem.* 79 (2007) 8639–8643.
- [6] B. Sebez, B. Ogorevc, S.B. Hocevar, M. Veber, Functioning of antimony film electrode in acid media under cyclic and anodic stripping voltammetry conditions, *Anal. Chim. Acta* 785 (2013) 43–49.
- [7] H. Sopha, V. Jovanovski, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, In-situ plated antimony film electrode for adsorptive cathodic stripping voltammetric measurement of trace nickel, *Electrochem. Commun.* 20 (2012) 23–25.
- [8] E. Tesarova, L. Baldrianova, S.B. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc, Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1506–1510.
- [9] B. Nigović, S.B. Hocevar, Square-wave voltammetric determination of pantoprazole using ex situ plated antimony-film electrode, *Electrochim. Acta* 109 (2013) 818–822.
- [10] T. Bassie, K. Siraj, T.E. Tesema, Determination of heavy metal ions on glassy carbon electrode modified with antimony, *Adv. Sci. Eng. Med.* 5 (2013) 275–284.
- [11] E. Svobodová, L. Baldrianová, S.B. Hocevar, I. Švancara, Electrochemical stripping analysis of selected heavy metals at antimony trioxide-modified carbon paste electrode, *Int. J. Electrochem. Sci.* 7 (2012) 197–210.
- [12] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, T. Spiliotis, Novel disposable microfabricated antimony-film electrodes for adsorptive stripping analysis of trace Ni(II), *Electrochem. Commun.* 11 (2009) 250–253.
- [13] K.E. Toghill, L. Xiao, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, Electroanalytical determination of cadmium(II) and lead(II) using an antimony nanoparticle modified boron-doped diamond electrode, *Electroanalysis* 21 (2009) 1113–1118.
- [14] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Coating methods: modifiers and applications of bismuth screen-printed electrodes, *TrAC Trends Anal. Chem.* 46 (2013) 15–29.
- [15] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Sputtered bismuth screen-printed electrode: a promising alternative to other bismuth modifications in the voltammetric determination of Cd(II) and Pb(II) ions in groundwater, *Talanta* 119 (2014) 348–352.
- [16] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, A novel sputtered bismuth screen-printed electrode for voltammetric determination of trace metal ions in well water, *Electroanalysis* 26 (2014) 2168–2172.
- [17] V. Sosa, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Can bismuth film screen printed carbon electrodes be used to study complexation? *Talanta* 107 (2013) 356–360.
- [18] M. Slavec, S.B. Hocevar, L. Baldrianova, E. Tesarova, I. Svancara, B. Ogorevc, K. Vytras, Antimony film microelectrode for anodic stripping measurement of cadmium(II); lead(II) and copper(II), *Electroanalysis* 22 (2010) 1617–1622.
- [19] A.M. Ashrafi, K. Vytras, New procedures for voltammetric determination of copper (II) using antimony film-coated carbon paste electrodes, *Electrochim. Acta* 73 (2012) 112–117.
- [20] C. Chen, X. Niu, Y. Chai, H. Zhao, M. Lan, Y. Zhu, G. Wei, Determination of lead(II) using screen-printed bismuth-antimony film electrode, *Electroanalysis* 25 (2013) 1446–1452.
- [21] X. Niu, H. Zhao, M. Lan, Disposable screen-printed antimony film electrode modified with carbon nanotubes/ionic liquid for electrochemical stripping measurement, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9921–9925.
- [22] M. Maczuga, A. Economou, A. Bobrowski, M.I. Prodromidis, Novel screen-printed antimony and tin voltammetric sensors for anodic stripping detection of Pb(II) and Cd(II), *Electrochim. Acta* 114 (2013) 758–765.

10.2. Discusión de resultados

La caracterización morfológica de la superficie de los electrodos se llevó a cabo con un microscopio electrónico de barrido JSM 7100FE de JEOL (Japón). En la Figura 18 se muestran las imágenes obtenidas con un aumento de 10.000x de las superficies de un SPCE sin modificar (Figura 18a) y de diferentes SbSPEs (Figura 18b-d). En estas imágenes se pueden observar claramente las diferencias entre las superficies de los SbSPEs. Las superficies de la Figura 18 b-d son totalmente distintas a la del SPCE sin modificar de la Figura 18a, en ellas se observan partículas de antimonio de diversos tamaños, apariencia y distribución. Si se compara el SbSPCE modificado vía *in-situ* (Figura 18b) con un SbSPCE modificado vía *ex-situ* (Figura 18c) se observa que en el *ex-situ* SbSPCE las partículas son más grandes y brillantes que en el *in-situ* SbSPCE aunque no cubren por completo la superficie del electrodo. En el Sb_{Sputtered} SPE (Figura 18d) las partículas son más grandes y compactas evidenciando que esta superficie electródica es totalmente diferente al resto de las superficies de los SbSPEs, debido a que la película de este electrodo se obtiene depositando directamente el antimonio mediante la técnica de *sputtering* sobre la superficie cerámica del electrodo, mientras que en los otros la formación de la película se realiza electrodepositando el Sb de manera *in-situ* o *ex-situ* sobre una superficie de carbono.

Primeramente se establecieron las condiciones óptimas para la formación de la película como son la concentración de antimonio y el pH de la disolución. Seguidamente, se optimizaron los parámetros electroquímicos para la determinación voltamperométrica de metales pesados, y se procedió a la caracterización de los electrodos. El SbSPE considerado para llevar a cabo el Trabajo 4 (Analytica Chimica Acta 855 (2015) 34–40) fue el SbSPCE modificado vía *in-situ*.

Después de diferentes experimentos se concluyó que la concentración óptima de Sb(III) que se debía añadir a la disolución de análisis era de 0,5 mg L⁻¹.

Los estudios realizados indicaron que es necesario aplicar un potencial de condicionamiento de +0.5 V durante 15 s antes de cada medida. Se optimizaron los parámetros electroquímicos (E_d y t_d), así como las condiciones de medida (pH) para la determinación voltamperométrica de Cd(II), Pb(III) y Cu(II).

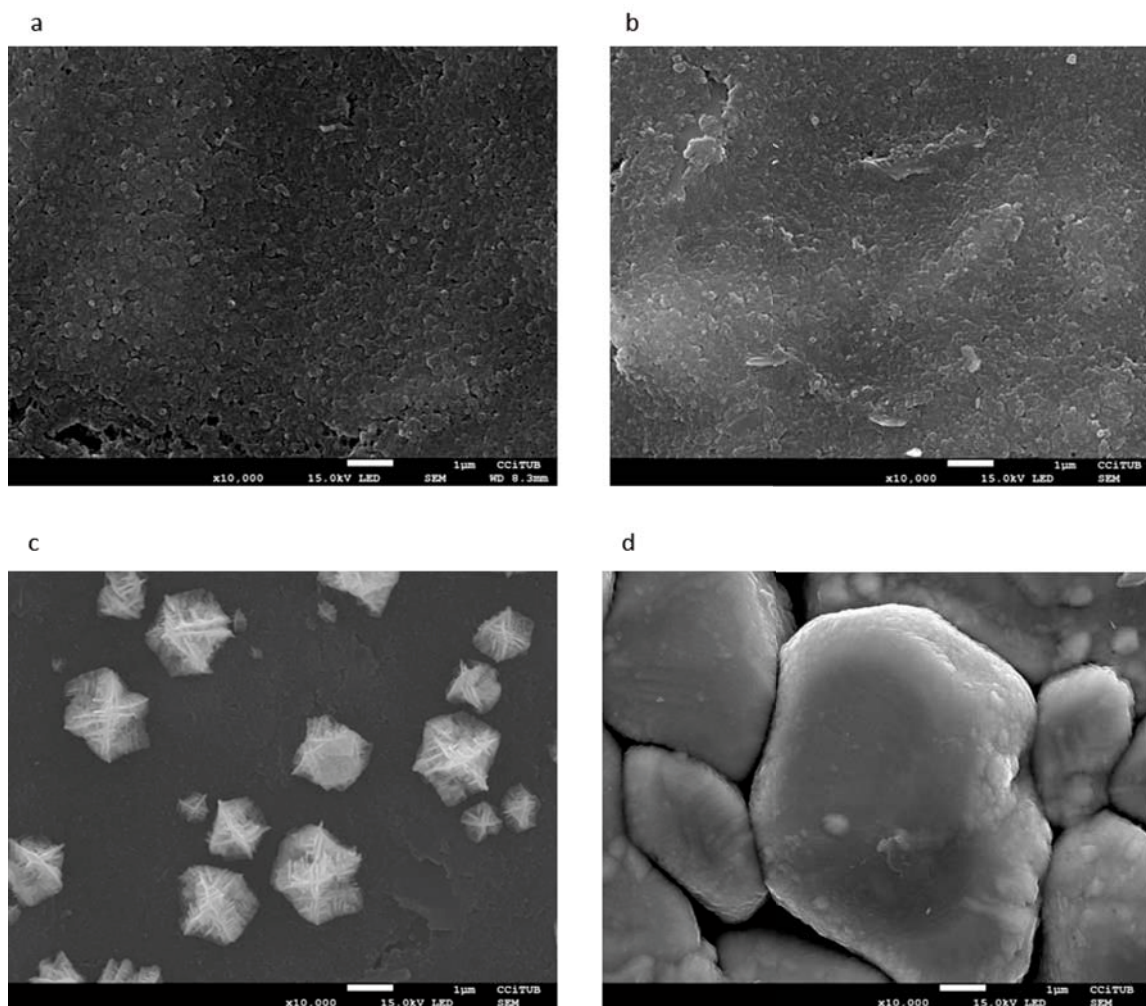


Figura 18. Micrografías de la superficie de los electrodos de antimonio: a) electrodos serigrafiados de carbono comercial (SPCE); b) electrodo de antimonio modificando vía *in-situ*; c) electrodo de antimonio modificando vía *ex-situ*; d) electrodo comercial obtenido vía *sputtering*. Resolución de 1 μm , magnificación de 10.000x y potencial de aceleración de 15,0 kV.

La selección del potencial de deposición óptimo es vital para la determinación de los metales de interés. En la Figura 2 (Trabajo 4) se muestran las medidas voltamperométricas llevadas a cabo a tres E_d diferentes (-0,5 V, -0,7 V y -1,2 V) en una disolución que contiene los metales objeto de estudio. A un E_d de -0,5 V se observa un pico de Cu(II) no muy bien definido y fuertemente solapado con el pico de Sb(III). A un E_d de -0,7 V se obtienen picos bien definidos de Cu(II) y Pb(II), aunque, se observa un pequeño solapamiento entre el pico de Cu(II) y el pico del Sb(III). Finalmente, a un E_d de -1,2 V, se obtienen picos bien definidos para el Cd(II), el Pb(II) y el Cu(II), aunque, se observa un leve solapamiento entre el pico de Cu(II) y el pico del Sb(III). Así pues, se concluyó que los E_d óptimos eran de -0,7 V para la determinación de Cu(II) y de Pb(II) y de -1,2 V para la determinación de los tres metales. La optimización del t_d , se

llevó a cabo aplicando t_d desde 30 s hasta 180 s a un E_d de -1,2 V, observándose picos claramente bien definidos de los metales a partir de 90 s hasta 180 s, seleccionándose un t_d de 120 s. El efecto del pH en la determinación voltamperométrica de metales se estudió considerando tres valores de pH: *i*) pH 2,0 (HCl); *ii*) pH 4,5 (acético/acetato), y *iii*) pH 6,8 (maleico/maleato). La Figura 3 A-C (Trabajo 4) muestra el comportamiento de los metales estudiados a los tres pH considerados. Se observa un pico del Pb(II) bien definido a -0,51 V que aumenta proporcionalmente con la concentración del metal, mientras que el pico del Cd(II) no crece de forma proporcional al aumentar la concentración del metal, por lo que está claro que este pH afecta al crecimiento del pico de reoxidación del Cd(II); mientras que el Cu(II) presenta un pico a -0,21 V, fuertemente solapado con el pico de Sb(III). A pH 4,5 se observó una mejor respuesta (Figura 3 B del Trabajo 4), obteniéndose picos bien definidos para los tres metales considerados, cuyo crecimiento es proporcional al incremento de la concentración. Además, a este pH, el pico del Cu(II) prácticamente no se encuentra solapado con el pico del Sb(III). Finalmente, a pH 6,8 (Figura 3 C) se obtiene un pico relativamente bien definido de Cu(II) completamente separado del pico de Sb(III), pero no se obtienen picos de reoxidación para el Cd(II) ni para el Pb(II). A pesar que se vio que el pico de Cu(II) aumenta de forma proporcional con la concentración del metal, las intensidades de los picos son menores que las observadas a pH 4,5. Por lo tanto, resulta evidente que este pH afecta drásticamente la reoxidación del Cd(II) y Pb(II) probablemente debido a la presencia de la hidrólisis de alguno de los metales y/o a la posible complejación con el sistema amortiguador. Así pues, se concluyó que el pH más favorable para la determinación simultánea de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) utilizando el *in-situ* SbSPCE era el pH 4,5.

El calibrado de datos, se llevó a cabo considerando los dos E_d seleccionados (-0,7 V para Pb(II) y Cu(II) y -1,2 V para Pb(II), Cd(II) y Cu(II)). En la Tabla 1 (Trabajo 4) se presentan los resultados del calibrado de datos. Los LODs y LOQs se calcularon considerando 3 y 10 veces, respectivamente, la desviación estándar de la ordenada al origen partido por la pendiente de la curva de calibrado de cada metal. El límite inferior del intervalo de linealidad se estableció a partir del correspondiente valor de LOQ.

Para la determinación del LOD y el LOQ, en todos los casos se obtuvieron picos de redisolución bien definidos para todos los metales considerados y respuestas lineales a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$. Al comparar los LODs y los LOQs de los diferentes metales,

obtenidos aplicando los E_d seleccionados (-1,2 V o -0,7 V) se observa lo siguiente: *i*) en el caso del Pb(II), el LOD y el LOQ son independientes del potencial de deposición; y *ii*) para el Cu(II), el LOD y el LOQ son ligeramente más bajos a un E_d de -0,7 V. Al comparar los LODs del Cd(II) y del Pb(II) obtenidos en este estudio con los reportados en otros estudios [33,62] se observa que son un poco más altos. En cambio el LOD obtenido para el Cu(II), en la determinación simultánea junto al Pb(II) y al Cd(II) (E_d de -1,2 V), es comparable a estudios previos en los que se ha determinado de forma individual el Cu(II) usando un electrodo de antimonio [62,63]. En cambio, cuando se aplicó un E_d de -0,7 V se obtuvo un LOD de Cu(II) más bajo que los reportados [62–64]. Además los LODs obtenidos en este estudio para el Cu(II), son más bajos que los obtenidos utilizando un electrodo *in-situ* BiSPCE [139]. Por lo tanto, los LODs y LOQs obtenidos demuestran que el *in-situ* SbSPCE puede ser una alternativa a los BiSPE para la determinación simultánea de estos metales a niveles de trazas en muestras naturales, sin presentar problemas de competencia entre el Cu(II) y el Sb(III) por electrodepositarse en la superficie del electrodo al realizar las medidas voltamperométricas.

Una vez establecidos los parámetros analíticos se procedió a la determinación de Cd(II), Pb(II) y Cu(II) en una muestra de material de referencia certificado correspondiente a una agua subterránea como ejemplo de la aplicabilidad de este dispositivo en el análisis de muestras naturales. La determinación de los metales se realizó por el método de las adiciones estándar. Las medidas voltamperométricas se llevaron a cabo aplicando nuevamente los dos potenciales de deposición (-0,7 V y -1,2 V). El análisis se realizó por triplicado, utilizándose para el análisis completo de cada réplica el mismo dispositivo. En las Figuras 4A y 4C del Trabajo 4, se pueden observar los voltamperogramas obtenidos en el análisis de la muestra de agua subterránea utilizando el *in-situ* SbSPCE, a ambos potenciales de deposición y las correspondientes curvas de calibrado de Cu(II) obtenidas con el método de las adiciones estándar (Figura 4B y 4D). El comportamiento del dispositivo en el análisis de la muestra fue similar al obtenido en el calibrado de datos. Los resultados obtenidos mostraron que el Pb(II) solamente se pudo detectar y no cuantificar, debido a que la concentración de este metal en la muestra de agua certificada estaba por debajo de su LOQ; mientras que el Cd(II) no se pudo ni cuantificar ni detectar debido a que la concentración de este metal en la muestra estaba por debajo de su LOD. Los resultados de la determinación voltamperométrica de

los metales en el agua subterránea se presentan en la Tabla 2 del Trabajo 4. Se muestra una buena concordancia entre el Cu(II) a ambos potenciales de deposición, así como con el valor de la concentración de Cu(II) cuantificada en el material de referencia. Las desviaciones estándar relativas (RSD %) y el error relativo (RE %) fueron más altos en las determinaciones en las que se aplicó un E_d de -1,2 V que en las que se aplicó un E_d de -0,7 V, probablemente debido al solapamiento entre el Cu(II) y el Sb(III) existente a un E_d de -1,2 V que no permite realizar una medida tan precisa de los picos. Sin embargo, los resultados obtenidos confirman la aplicabilidad del *in-situ* SbSPCE para la determinación a niveles bajos de concentración de Cu(II) en presencia de Cd(II) y Pb(II) en muestras ambientales.

Adicionalmente, se realizaron estudios para la determinación simultánea de Pb(II), Cd(II) y Cu(II) utilizando un SbSPCE modificado vía *ex-situ* y un Sb_{Sputtered} SPE a pH 4,5.

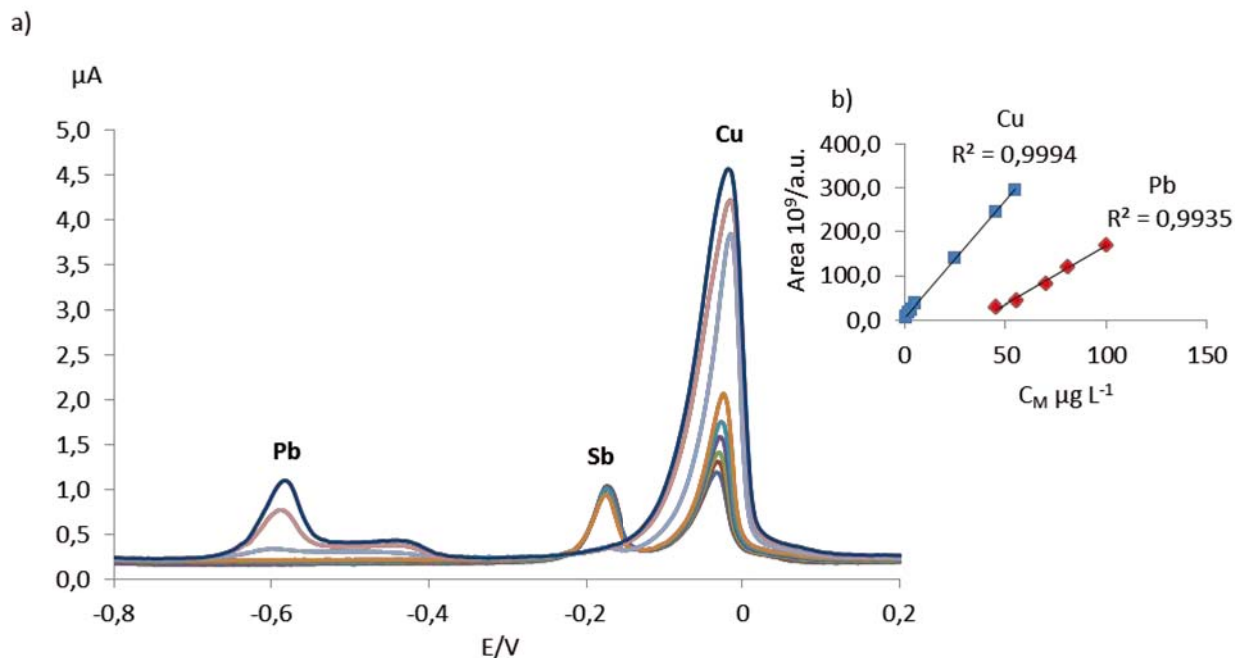


Figura 19. Medidas de calibrado de Pb(II) y Cu(II) por DPASV con un *ex-situ* SbSPCE, en disolución amortiguadora de acético/acetato pH 4,5 y KNO_3 0,01 mol L^{-1} , E_d de -0,8 V, durante un t_d de 120 s, y t_r de 30 s. Potencial de condicionamiento de 0,5 V durante 15 s. a) voltamperograma de Pb(II) y Cu(II), b) curva de calibrado para el plomo y el cobre.

Los resultados proporcionados con ambos electrodos no fueron los esperados, debido a problemas en la determinación de Cu(II), ya que la señal de este metal aparece a un potencial cercano al potencial del Sb(III). En el caso de un electrodo *ex-situ* SbSPCE (ver Figura 19) se observó que a pesar que la película de antimonio parece mantenerse en la superficie de carbono al realizar medidas de Cu(II) y que la curva de calibrado es lineal (Figura 19b) es de suponer que al aplicar potenciales más positivos que el potencial estándar del antimonio la superficie del electrodo sufrirá cambios.

La señal de Pb(II) muestra un pico bien definido a bajas concentraciones, pero al aumentar la concentración se divide en dos señales solapadas. Mientras que la señal de Cu(II) muestra un pico bien definido a concentraciones altas, disminuyendo las señales debidas al Sb(III). En la Tabla 9 se presenta los resultados de la calibración de datos utilizando el electrodo *ex-situ* SbSPCE; los LODs y LOQs se calculan como ya se ha explicado anteriormente.

Tabla 9. Rectas de calibrado y parámetros de calidad para la determinación simultánea de Pb(II) y Cu(II) con un *ex-situ* SbSPCE en disolución amortiguadora acético/acetato de pH 4.5 y fuerza iónica de 0.01 mol L⁻¹ Ed de -0.8 V y t_d de 120 s.

Pb (II)				Cu(II)			
Regresión	R ²	*Intervalo Lineal (μg L ⁻¹)	LOD (μg L ⁻¹)	Regresión	R ²	*Intervalo Lineal (μg L ⁻¹)	LOD (μg L ⁻¹)
y = 2,67x - 100,37	0,994	34,1-100,26	10,2	y = 5,30x + 5,59	0,999	2,6-54,76	0,79

*El menor valor del intervalo lineal se considera a partir del LOQ.

Considerando los resultados obtenidos se procedió a la determinación de Pb(II) y Cu(II) en la muestra de material de referencia certificado correspondiente a una agua subterránea, para verificar la aplicabilidad del *ex-situ* SbSPCE en la determinación de Pb(II) y Cu(II). En la Figura 20 se pueden observar los voltamperogramas obtenidos en el análisis de la muestra de agua subterránea y la correspondiente curva de calibrado para el Cu(II) obtenida con el método de las adiciones estándar. El comportamiento del dispositivo en el análisis de la muestra fue similar al observado en el calibrado de datos.

Los resultados obtenidos mostraron que no se detecta el Pb(II) debido a que la concentración de este metal en la muestra de agua certificada estaba por debajo de su LOD, sin embargo se determinó una concentración de $44,4 \mu\text{g L}^{-1}$ de Cu(II) en la muestra, en buena concordancia con el valor de la concentración certificada en el material de referencia ($45,7 \mu\text{g L}^{-1}$), con una RSD de 0,5 % y un RE de 2.9 %, para $n = 2$, siendo n el número de replicados analizados.

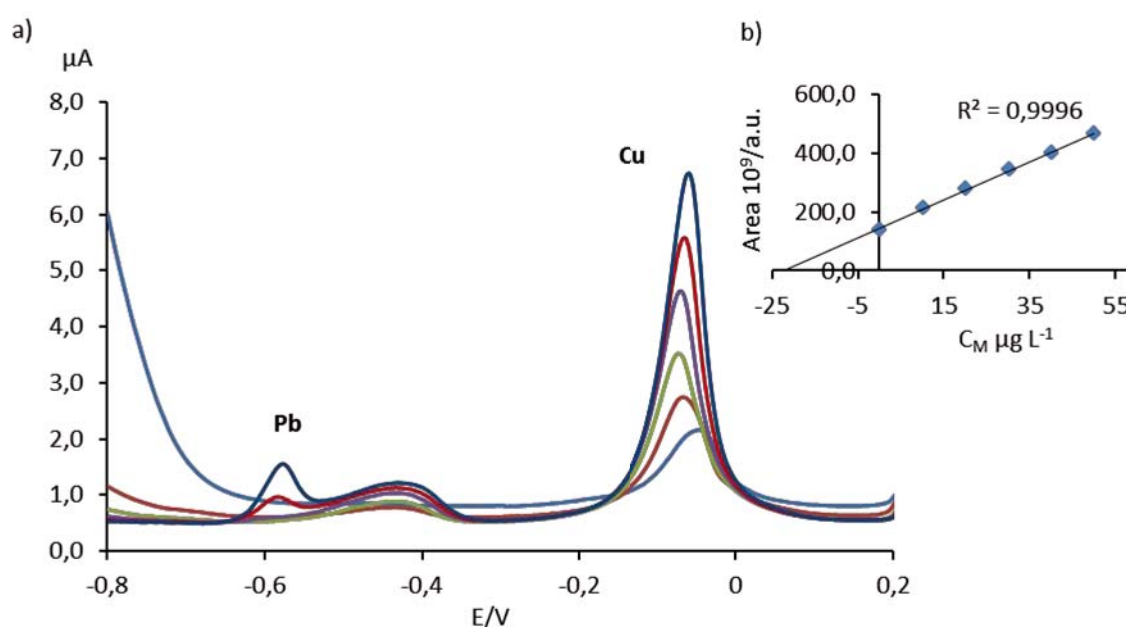


Figura 20. a) Medidas por DPASV en agua subterránea (material de referencia BCR®-610), utilizando un *ex-situ* SbSPCE, en disolución amortiguadora de acético/acetato pH 4,5 y KNO_3 0.01 mol L^{-1} , E_d de -0,8 V, durante un t_d de 120 s, y t_r de 30 s. Potencial de condicionamiento de 0,5 V durante 15 s; b) curva de calibración por adición estándar de Cu(II).

En el caso de la aplicación del electrodo $\text{Sb}_{\text{Sputtered}}$ SPE, se observó que el blanco presentaba una señal grande y ancha a potenciales cercanos al potencial del antimonio que impidió la determinación del Cu(II) (Figura 21). Sin embargo, se requieren más estudios para establecer las capacidades de estos electrodos para la determinación de otros iones metálicos.

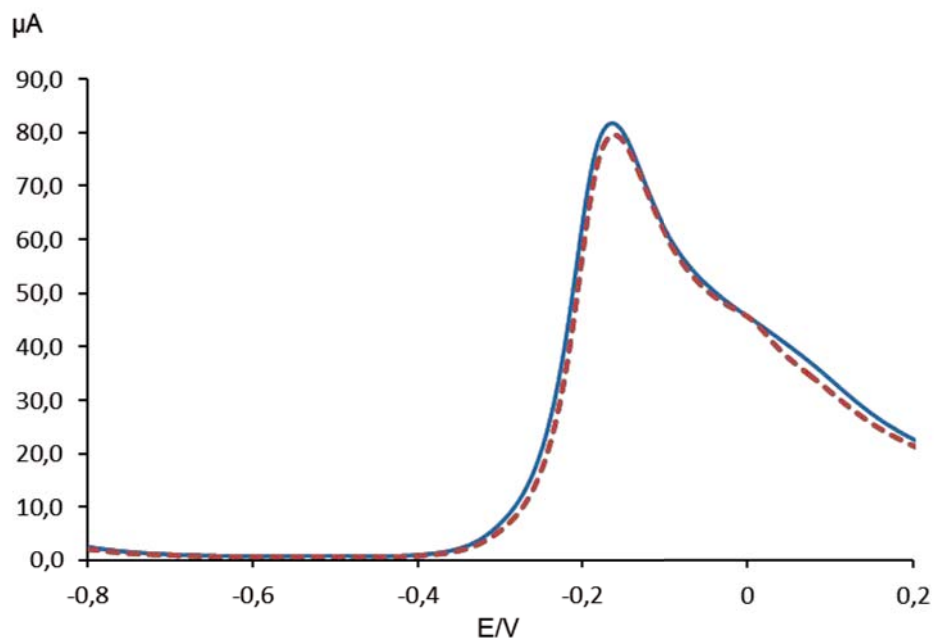


Figura 21. Medidas por DPASV con un $\text{Sb}_{\text{sputtered}}$ SPE en disolución amortiguadora de acético/acetato pH 4,5 y KNO_3 $0,01 \text{ mol L}^{-1}$, E_d de $-0,8 \text{ V}$, durante un t_d de 120 s, y t_r de 30 s. Potencial de condicionamiento de $+0,25 \text{ V}$ durante 30 s. La línea continua azul corresponde al blanco, y la línea cortada roja corresponde a una adición de Cu(II) de $50 \mu\text{g L}^{-1}$.

Para finalizar este bloque, la Tabla 10 muestra las ventajas y desventajas de los electrodos BiSPE y SbSPE.

Tabla 10. Ventajas y desventajas de los electrodos BiSPE y SbSPE.

Electrodos	Ventajas	Desventajas
BiSPE	• Presentan LODs comparables a los obtenidos con un HMDE para la determinación de Pb(II) y Cd(II) y más bajos que los obtenidos con el <i>in-situ</i> SbSPCE. • Los BiSPE, no requieren de la aplicación de un potencial de condicionamiento a diferencia del <i>in-situ</i> SbSPCE. • Los electrodos de Bi preparados vía <i>in-situ</i>, <i>ex-situ</i> y el Bi_{sp}SPE pueden ser utilizados para realizar varias medidas, completando el análisis de una réplica de una muestra o de una curva de calibrado al igual que el <i>in-situ</i> SbSPCE. • Para la determinación de Cd(II) y Pb(II), los electrodos <i>ex-situ</i> BiSPCE y el Bi_{ox}SPCE necesitan un t_d de 120 s y 45 s, respectivamente, igual o menor que el <i>in-situ</i> SbSPCE. • En general, el coste de los dispositivos es parecido al del <i>in-situ</i> SbSPCE.	• El <i>ex-situ</i> BiSPCE presenta un limitado intervalo anódico, que impide ser utilizado en la determinación de especies con potenciales más positivos o similares al Bi. • En general la sensibilidad del electrodo disminuye en medios fuertemente ácidos. • En la determinación de Cd(II) y Pb(II) el <i>in-situ</i> BiSPCE necesita mayor t_d (300 s) que el <i>in-situ</i> SbSPCE (120 s).
SbSPE	• El dispositivo <i>in-situ</i> SbSPCE presenta LODs más bajos para el Cu(II) comparado con el <i>in-situ</i> BiSPCE (reportado en otros estudios). • El <i>in-situ</i> SbSPCE presenta una pequeña señal de reoxidación del antimonio comparada con las señales obtenidas con los electrodos de bismuto o de mercurio, característica que permitiría la determinación de analitos con potenciales de reoxidación cercanos al potencial del Sb, e.g. Cu(II). • Para la determinación de Cu(II) con el <i>in-situ</i> SbSPCE el Sb(III) no compite con el Cu(II) para depositarse en la superficie del electrodo, a diferencia de los electrodos de bismuto. • El <i>in-situ</i> SbSPCE requiere menor t_d (120 s) para la determinación de metales que el correspondiente <i>in-situ</i> BiSPCE (300 s) y que el Bi_{sp}SPE (360 s). • El dispositivo <i>in-situ</i> SbSPCE puede ser utilizado para realizar varias medidas, completando el análisis de una réplica de una muestra o una curva de calibrado. • En general, el coste del <i>in-situ</i> SbSPCE es parecido al de los que los BiSPEs.	• Los LODs del Pb(II) y Cd(II) son más altos que los obtenidos con los BiSPEs. • Al trabajar con el <i>in-situ</i> SbSPCE, un medio de pH 6,8 afecta los picos de reoxidación del Cd(II) y del Pb(II) a diferencia del <i>ex-situ</i> BiSPCE y del Bi_{sputtered} SPE, que permiten determinar estos metales en un medio de pH 6,0.

V

Conclusiones

V. Conclusiones

Los estudios presentados en la memoria de esta tesis doctoral permiten llegar a las siguientes conclusiones:

1. Los electrodos basados en bismuto y antimonio han demostrado ser una buena alternativa a los electrodos de mercurio ya que presentan un comportamiento electroquímico similar frente a la determinación de metales pesados a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ en muestras de interés medio ambiental. Por otro lado son menos tóxicos y más respetuosos con el medioambiente que los de mercurio
2. Los electrodos de BiSPCE y SbSPCE modificados vía *ex-situ* requieren, a diferencia de los modificados vía *in-situ*, de una etapa previa de electrodeposición de la película de bismuto o antimonio sobre la superficie electródica. Así mismo, los Bi_{Ox}SPCE necesitan una activación previa de la superficie en la cual el Bi(II) es reducido a bismuto metálico. Por el contrario los BiSPEs obtenidos comercialmente vía sputtering no necesitan un tratamiento previo al análisis.
3. Respecto a su comportamiento analítico, los diferentes BiSPE presentaron señales de redisolución adecuadas para el Cd(II) y el Pb(II) a excepción del Bi_{Ox}SPCE que a concentraciones altas la señal del Cd(II) da lugar a dos picos solapados y la señal del Pb(II) pierde simetría. Aún así, los diferentes BiSPE presentan una excelente respuesta lineal del área versus la concentración de metal. Los LODs y LOQs obtenidos para los diferentes BiSPE son del orden de $\mu\text{g L}^{-1}$, presentando el Bi_{sp}SPE y el Bi_{Ox}SPCE LODs y LOQs un poco más bajos que los obtenidos utilizando un *in-situ* o un *ex-situ* BiSPCE.
4. El Bi_{sp}SPE ha demostrado ser un buen sustituto para los electrodos de mercurio para el análisis de trazas de metales pesados por DPASV. Presenta un comportamiento analítico similar al HMDE, proporcionando señales bien definidas para el Cd(II) y el Pb(II). Aunque, en comparación con el HMDE se requieren tiempos de deposición más grandes para obtener valores de LOD y LOQ similares.
5. Los diferentes BiSPEs considerados han sido utilizados con éxito para la determinación simultánea de Cd(II) y Pb(II) a niveles traza en una muestra de

agua subterránea correspondiente a un material de referencia certificado con una alta reproducibilidad y un error relativo alrededor del 2% en el caso de los *in-situ* BiSPCE, *ex-situ* BiSPCE y Bi_{sp}SPE. Además, el Bi_{sp}SPE se ha aplicado a la determinación simultánea de Pb(II) y Cd(II) en muestras reales de aguas de pozo, obteniéndose resultados comparables estadísticamente a los encontrados con un HMDE.

6. El electrodo *ex-situ* BiSPCE es una buena alternativa al electrodo de mercurio para estudios electroquímicos y quimiométricos de complejación del metal con péptidos ricos en grupos tiol. En particular, las matrices de datos correspondientes a los sistemas Cd(II)-GSH y Cd(II)-PC₂ estudiados utilizando un *ex-situ* BiSPCE proporcionan una información equivalente a la obtenida cuando en la medida se utiliza un electrodo de mercurio.
7. El tratamiento quimiométrico MCR-ALS ha sido aplicado por primera vez de manera exitosa a matrices de datos obtenidas utilizando un BiSPCE. A pesar de algunas incertidumbres atribuidas a la forma complicada de los voltamperogramas, especialmente en el caso del sistema Cd(II)-PC₂, se puede observar la formación de los complejos 1:2 y 1:1 Cd²⁺:GSH y 1:2 Cd²⁺:PC₂ en plena concordancia con los resultados obtenidos con los electrodos de mercurio.
8. El *in-situ* SbSPCE ha demostrado ser una buena alternativa al *in-situ* BiSPCE para la determinación simultánea de Cd(II), Pb(II) y Cu(II), ya que a diferencia del *in-situ* BiSPCE, no se ha detectado competencia en la electrodeposición del Cu(II) y el Sb(II) en la superficie electródica. Respecto a su comportamiento analítico, el *in-situ* SbSPCE proporciona señales bien definidas de los tres metales considerados, obteniéndose LODs y LOQs a niveles de $\mu\text{g L}^{-1}$ para todos los metales.
9. El *in-situ* SbSPCE ha sido aplicado a la determinación simultánea de Pb(II), Cd(II) y Cu(II) de una muestra de agua subterránea correspondiente a un material de referencia certificado, obteniéndose resultados satisfactorios con una alta reproducibilidad y una buena veracidad.

VI

Bibliografía

VI. Bibliografía

- [1] S.E. Manahan, *Environmental chemistry*, 7th ed., CRC Press LLC, Boca Raton, 2000.
- [2] G.F. Nordberg, B.A. Fowler, M. Nordberg, L.T. Friberg, *Handbook on the toxicology of metals*, 3rd ed., Elsevier Inc., London, 2007.
- [3] J.H. Duffus, "Heavy metals" a meaningless term? (*IUPAC Technical report*), Pure Appl. Chem. 74 (2002) 793–807.
- [4] C. Baird, *Química ambiental*, 2nd ed., Reverté S. A., Barcelona, 2001.
- [5] B.J. Nebel, R.T. Wrigth, *Environmental science: the way the world works*, 4th ed., Prentice-Hall International, New Jersey, 1993.
- [6] J.E. Fergusson, *The heavy elements: chemistry, environmental impact and health effects*, 1st ed., Pergamon Press, Oxford, 1991.
- [7] M. Lippmann, *Environmental toxicants: human exposures and their health effects*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2000.
- [8] M.C. Jacobson, R.J. Charlson, H. Rodhe, G.H. Orians, *Earth system science: from biogeochemical cycles to global change*, 1st ed., Academic Press, San Diego, 2000.
- [9] M.E. Shils, M. Shike, A.K. Ross, B. Caballero, R.J. Cousins, *Modern nutrition in health and disease*, 9th ed., Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, 1999.
- [10] M. van der Perk, *Soil and water contamination*, 2nd ed., CRC Press/balkema, Leiden, 2012.
- [11] R.E. Burch, H.K.J. Hahn, J.F. Sullivan, *Newer aspects of the roles of zinc, manganese, and copper in human nutrition*, Clin. Chem. 21 (1975) 501–520.
- [12] L.M. Gaetke, C.K. Chow, *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*, Toxicology 189 (2003) 147–163.
- [13] G.W. VanLoon, S.J. Duffy, *Environmental chemistry: a global perspective*, 1st ed., Oxford University Press, Oxford, 2000.
- [14] Parlamento Europeo y del Consejo, *Relativo a la prohibición de la exportación de mercurio metálico y ciertos compuestos y mezclas de mercurio y al almacenamiento seguro de mercurio metálico*, D. Of. La Unión Eur. 2008 (2008) 304/75–304/79. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32008R1102&from=ES> (accessed December 9, 2014).

- [15] L.M.L. Nollet, L.S.P. De Gelder, *Handbook of water analysis*, 3rd ed., CRC Press, Boca Raton, 2014.
- [16] J. Barek, A.G. Fogg, A. Muck, J. Zima, *Polarography and voltammetry at mercury electrodes*, Crit. Rev. Anal. Chem. 31 (2001) 291–309.
- [17] J. Buffle, R.A. Chalmers, *Complexation reactions in aquatic systems: an analytical approach*, 1st ed., Ellis Horwood Limited, Chichester, 1988.
- [18] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Diaz-Cruz, E. Casassas, *Voltammetry of metal ion—macromolecule interactions: application to speciation problems*, TrAC Trends Anal. Chem. 12 (1993) 276–286.
- [19] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Diaz-Cruz, R. Tauler, *Multivariate curve resolution with alternating least squares optimisation: a soft-modelling approach to metal complexation studies by voltammetric techniques*, TrAC Trends Anal. Chem. 19 (2000) 49–61.
- [20] J. Wang, *Stripping analysis. Principles, instrumentation, and application*, VCH, Deerfield Beach, 1985.
- [21] J. Wang, *Analytical electrochemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, 2006.
- [22] F. Szabadváry, *History of analytical chemistry*, 1st ed., Pergamon Press, London, 1966.
- [23] J.M. Pingarrón Carrazón, P. Sánchez Batanero, *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*, Síntesis, Madrid, 1999.
- [24] A. Economou, P.R. Fielden, *Mercury film electrodes: developments, trends and potentialities for electroanalysis*, Analyst 128 (2003) 205–212.
- [25] P.T. Kissinger, W.R. Heineman, *Laboratory techniques in electroanalytical chemistry*, 2nd ed., Marcel Dekker Inc., New York, 1996.
- [26] Parlamento Europeo y del Consejo, *Sobre restricciones a la utilización de determinadas sustancias peligrosas en aparatos eléctricos y electrónicos*, 8 Junio 2011 (2011) 22935–22954. <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2011:174:0088:0110:ES:PDF> (accessed December 9, 2014).
- [27] SOCOPSE, *An inventory and assessment of options for reducing emissions: mercury*, (2009) 1–51. <http://www.socopse.se/download/18.3cd20f1b1243376c1168000581/1350483854220/SR-Mercury.pdf> (accessed December 9, 2014).
- [28] J. Wang, B. Tian, *Mercury-free disposable lead sensors based on potentiometric stripping analysis at gold-coated screen-printed electrodes*, Anal. Chem. 65 (1993) 1529–1532.

- [29] Y. Bonfil, E. Kirowa-Eisner, *Determination of nanomolar concentrations of lead and cadmium by anodic-stripping voltammetry at the silver electrode*, Anal. Chim. Acta 457 (2002) 285–296.
- [30] M.A. Nolan, S.P. Kounaves, *Microfabricated array of iridium microdisks as a substrate for direct determination of Cu^{2+} or Hg^{2+} using square-wave anodic stripping voltammetry*, Anal. Chem. 71 (1999) 3567–3573.
- [31] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A. Farias, *Bismuth-coated carbon electrodes for anodic stripping voltammetry*, Anal. Chem. 72 (2000) 3218–3222.
- [32] A. Economou, *Bismuth-film electrodes: recent developments and potentialities for electroanalysis*, TrAC Trends Anal. Chem. 24 (2005) 334–340.
- [33] S.B. Hocevar, I. Svancara, B. Ogorevc, K. Vytras, *Antimony film electrode for electrochemical stripping analysis*, Anal. Chem. 79 (2007) 8639–8643.
- [34] F. Arduini, J.C. Quintana, A. Amine, G. Palleschi, D. Moscone, *Bismuth-modified electrodes for lead detection*, TrAC Trends Anal. Chem. 29 (2010) 1295–1304.
- [35] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Bismuth-coated screen-printed electrodes for stripping voltammetric measurements of trace lead*, Electroanalysis 13 (2001) 13–16.
- [36] I. Svancara, C. Prior, S.B. Hocevar, J. Wang, *A decade with bismuth-based electrodes in electroanalysis*, Electroanalysis 22 (2010) 1405–1420.
- [37] J. Wang, *Stripping analysis at bismuth electrodes: a review*, Electroanalysis 17 (2005) 1341–1346.
- [38] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Coating methods, modifiers and applications of bismuth screen-printed electrodes*, TrAC Trends Anal. Chem. 46 (2013) 15–29.
- [39] N. Lezi, A. Economou, J. Barek, *Electrodes modified with bismuth, antimony and tin precursor compounds for electrochemical stripping analysis of trace metals. A short review*, Sens. Electroanal. 8 (2014) 9–20.
- [40] M. de la Gala Morales, M.R. Palomo Marín, L. Calvo Blázquez, E. Pinilla Gil, *Applicability of the bismuth bulk rotating disk electrode for heavy metal monitoring in undisturbed environmental and biological samples: determination of Zn(II) in rainwater, tap water and urine*, Anal. Methods 6 (2014) 8668–8674.
- [41] M. de la Gala Morales, M.R. Palomo Marín, L. Calvo Blázquez, E. Pinilla Gil, *Performance of a bismuth bulk rotating disk electrode for heavy metal analysis: determination of lead in environmental samples*, Electroanalysis 24 (2012) 1170–1177.

- [42] J. Wang, J. Lu, Ü.A. Kirgöz, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Insights into the anodic stripping voltammetric behavior of bismuth film electrodes*, Anal. Chim. Acta 434 (2001) 29–34.
- [43] E.A. Hutton, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, M.R. Smyth, *Bismuth film electrode for simultaneous adsorptive stripping analysis of trace cobalt and nickel using constant current chronopotentiometric and voltammetric protocol*, Electrochem. Commun. 5 (2003) 765–769.
- [44] E. Chatzitheodorou, A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Trace determination of chromium by square-wave adsorptive stripping voltammetry on bismuth film electrodes*, Electroanalysis 16 (2004) 1745–1754.
- [45] G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, M. Sofoniou, *A study of bismuth-film electrodes for the detection of trace metals by anodic stripping voltammetry and their application to the determination of Pb and Zn in tapwater and human hair*, Talanta 61 (2003) 603–610.
- [46] R. Pauliukaite, R. Metelka, I. Svancara, A. Królicka, A. Bobrowski, K. Vytras, E. Norkus, K. Kalcher, *Carbon paste electrodes modified with Bi₂O₃ as sensors for the determination of Cd and Pb*, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 1155–1158.
- [47] M.A. Baldo, S. Daniele, *Anodic stripping voltammetry at bismuth-coated and uncoated carbon microdisk electrodes: application to trace metals analysis in food samples*, Anal. Lett. 37 (2005) 995–1011.
- [48] E.A. Hutton, J.T. van Elteren, B. Ogorevc, M.R. Smyth, *Validation of bismuth film electrode for determination of cobalt and cadmium in soil extracts using ICP-MS*, Talanta 63 (2004) 849–855.
- [49] J. Wang, R. Prakash Deo, Thongngamdee, B. Ogorevc, *Effect of surface-active compounds on the stripping voltammetric response of bismuth film electrodes*, Electroanalysis 13 (2001) 1153–1156.
- [50] J. Wang, J. Lu, *Bismuth film electrodes for adsorptive stripping voltammetry of trace nickel*, Electrochem. Commun. 2 (2000) 390–393.
- [51] D. Yang, L. Wang, Z. Chen, M. Megharaj, R. Naidu, *Investigation of copper(II) interference on the anodic stripping voltammetry of lead(II) and cadmium(II) at bismuth film electrode*, Electroanalysis 25 (2013) 2637–2644.
- [52] A. Uhl, W. Kestranek, *Die elektrometrische titration von Säuren und basen mit der antimon indikatorelektrode*, Monatshefte Für Chemie - Chem. Mon. 44 (1923) 29–34.
- [53] D.H. Brown, C.T. Gould, A. Tatevossian, *A robust pH electrode system for student use*, Arch. Oral Biol. 19 (1974) 601–603.
- [54] P.W. Alexander, J.P. Joseph, *A coated-metal enzyme electrode for urea determinations*, Anal. Chim. Acta 131 (1981) 103–109.

- [55] E. Kinoshita, F. Ingman, G. Edwall, S. Thulin, S. Głąb, *Polycrystalline and monocrystalline antimony, iridium and palladium as electrode material for pH-sensing electrodes*, *Talanta* 33 (1986) 125–134.
- [56] K.E. Toghill, L. Xiao, G.G. Wildgoose, R.G. Compton, *Electroanalytical determination of cadmium(II) and lead(II) using an antimony nanoparticle modified boron-doped diamond electrode*, *Electroanalysis* 21 (2009) 1113–1118.
- [57] B. Sebez, B. Ogorevc, S.B. Hocevar, M. Veber, *Functioning of antimony film electrode in acid media under cyclic and anodic stripping voltammetry conditions*, *Anal. Chim. Acta* 785 (2013) 43–49.
- [58] E. Tesarova, L. Baldrianova, S.B. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc, *Anodic stripping voltammetric measurement of trace heavy metals at antimony film carbon paste electrode*, *Electrochim. Acta* 54 (2009) 1506–1510.
- [59] E. Tesarová, K. Vytras, *Potentiometric stripping analysis at antimony film electrodes*, *Electroanalysis* 21 (2009) 1075–1080.
- [60] H. Xu, P. Yang, Q. Zheng, J. Liu, L. Jin, *A simple and sensitive method for the detection of trace Pb(II) and Cd(II) based on nafion-coated antimony film electrode*, *Chinese J. Chem.* 28 (2010) 2287–2292.
- [61] S. Dal Borgo, V. Jovanovski, S.B. Hocevar, *Antimony film electrode for stripping voltammetric measurement of Hg(II) in the presence of Cu(II)*, *Electrochim. Acta* 88 (2013) 713–717.
- [62] M. Slavec, S.B. Hocevar, L. Baldrianova, E. Tesarova, I. Svancara, B. Ogorevc, K. Vytras, *Antimony film microelectrode for anodic stripping measurement of cadmium(II), lead(II) and copper(II)*, *Electroanalysis* 22 (2010) 1617–1622.
- [63] A.M. Ashrafi, K. Vytras, *New procedures for voltammetric determination of copper (II) using antimony film-coated carbon paste electrodes*, *Electrochim. Acta* 73 (2012) 112–117.
- [64] A. Bobrowski, M. Putek, J. Zarebski, *Antimony film electrode prepared in situ in hydrogen potassium tartrate in anodic stripping voltammetric trace detection of Cd(II), Pb(II), Zn(II), Tl(I), In(III) and Cu(II)*, *Electroanalysis* 24 (2012) 1071–1078.
- [65] H. Sopha, V. Jovanovski, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *In-situ plated antimony film electrode for adsorptive cathodic stripping voltammetric measurement of trace nickel*, *Electrochem. Commun.* 20 (2012) 23–25.
- [66] V. Jovanovski, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Ex situ prepared antimony film electrode for electrochemical stripping measurement of heavy metal ions*, *Electroanalysis* 21 (2009) 2321–2324.

- [67] T. Bassie, K. Siraj, T.E. Tesema, *Determination of heavy metal ions on glassy carbon electrode modified with antimony*, Adv. Sci. Eng. Med. 5 (2013) 275–284.
- [68] E. Svobodova-Tesarova, L. Baldrianova, M. Stoces, I. Svancara, K. Vytras, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Antimony powder-modified carbon paste electrodes for electrochemical stripping determination of trace heavy metals*, Electrochim. Acta 56 (2011) 6673–6677.
- [69] A. Królicka, R. Pauliukaite, I. Svancara, R. Metelka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, K. Vytras, *Bismuth-film-plated carbon paste electrodes*, Electrochem. Commun. 4 (2002) 193–196.
- [70] J. Calvo Quintana, F. Arduini, A. Amine, F. Punzo, G.L. Destri, C. Bianchini, D. Zane, A. Curulli, G. Palleschi, D. Moscone, *Part I: A comparative study of bismuth-modified screen-printed electrodes for lead detection*, Anal. Chim. Acta 707 (2011) 171–177.
- [71] S.B. Hocevar, S. Daniele, C. Bragato, B. Ogorevc, *Reactivity at the film/solution interface of ex situ prepared bismuth film electrodes: A scanning electrochemical microscopy (SECM) and atomic force microscopy (AFM) investigation*, Electrochim. Acta 53 (2007) 555–560.
- [72] B. Nigović, S.B. Hocevar, *Square-wave voltammetric determination of pantoprazole using ex situ plated antimony-film electrode*, Electrochim. Acta 109 (2013) 818–822.
- [73] M. Maczuga, A. Economou, A. Bobrowski, M.I. Prodromidis, *Novel screen-printed antimony and tin voltammetric sensors for anodic stripping detection of Pb(II) and Cd(II)*, Electrochim. Acta 114 (2013) 758–765.
- [74] E. Svobodová, L. Baldrianová, S.B. Hocevar, I. Svancara, *Electrochemical stripping analysis of selected heavy metals at antimony trioxide-modified carbon paste electrode*, Int. J. Electrochem. Sci. 7 (2012) 197–210.
- [75] M. Stoces, S.B. Hocevar, I. Svancara, *Antimony trifluoride-modified carbon paste electrode for electrochemical stripping analysis of selected heavy metals*, Sens. Electroanal. 6 (2011) 205–218.
- [76] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, T. Speliotis, *Disposable mercury-free cell-on-a-chip devices with integrated microfabricated electrodes for the determination of trace nickel(II) by adsorptive stripping voltammetry*, Anal. Chim. Acta 622 (2008) 111–118.
- [77] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, C.E. Efstathiou, *Lithographically fabricated disposable bismuth-film electrodes for the trace determination of Pb(II) and Cd(II) by anodic stripping voltammetry*, Electrochim. Acta 53 (2008) 5294–5299.

- [78] C. Kokkinos, I. Raptis, A. Economou, T. Speliotis, *Determination of trace Tl(I) by anodic stripping voltammetry on novel disposable microfabricated bismuth-film sensors*, *Electroanalysis* 22 (2010) 2359–2365.
- [79] C. Kokkinos, A. Economou, M. Koupparis, *Determination of trace cobalt(II) by adsorptive stripping voltammetry on disposable microfabricated electrochemical cells with integrated planar metal-film electrodes*, *Talanta* 77 (2009) 1137–1142.
- [80] C. Kokkinos, A. Economou, *Tin film sensor with on-chip three-electrode configuration for voltammetric determination of trace Tl(I) in strong acidic media*, *Talanta* 125 (2014) 215–220.
- [81] C. Kokkinos, I. Raptis, A. Economou, T. Speliotis, *Disposable micro-fabricated electrochemical bismuth sensors for the determination of Tl(I) by stripping voltammetry*, *Procedia Chem.* 1 (2009) 1039–1042.
- [82] A. Vázquez Vaamonde, J.J. De-Damborenea González, *Ciencia e ingeniería de la superficie de los materiales metálicos*, CSIC, Madrid, 2000.
- [83] O.D. Renedo, M.A. Alonso-Lomillo, M.J.A. Martínez, *Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications*, *Talanta* 73 (2007) 202–219.
- [84] J.P. Hart, A. Crew, E. Crouch, K.C. Honeychurch, R.M. Pemberton, *Some recent designs and developments of screen-printed carbon electrochemical sensors/biosensors for biomedical, environmental, and industrial analyses*, *Anal. Lett.* 37 (2005) 789–830.
- [85] A. Hayat, J.L. Marty, *Disposable screen printed electrochemical sensors: tools for environmental monitoring*, *Sensors* 14 (2014) 10432–10453.
- [86] J. Wang, B. Tian, V.B. Nascimento, L. Angnes, *Performance of screen-printed carbon electrodes fabricated from different carbon inks*, *Electrochim. Acta* 43 (1998) 3459–3465.
- [87] J. Wang, M. Pedrero, H. Sakslund, O. Hammerich, J. Pingarron, *Electrochemical activation of screen printed carbon strips*, *Analyst* 121 (1996) 345–350.
- [88] I. Palchetti, C. Upjohn, A.P.F. Turner, M. Mascini, *Disposable screen-printed electrodes (SPE) mercury-free for lead detection*, *Anal. Lett.* 33 (2000) 1231–1246.
- [89] K. Ohfuji, N. Sato, N. Hamada-Sato, T. Kobayashi, C. Imada, H. Okuma, E. Watanabe, *Construction of a glucose sensor based on a screen-printed electrode and a novel mediator pyocyanin from Pseudomonas aeruginosa*, *Biosens. Bioelectron.* 19 (2004) 1237–1244.
- [90] M.F. Bergamini, A.L. Santos, N.R. Stradiotto, M.V.B. Zanoni, *Flow injection amperometric determination of procaine in pharmaceutical formulation using a screen-printed carbon electrode*, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 43 (2007) 315–319.

- [91] M.F. Bergamini, M.V. Boldrin Zanoni, *Anodic stripping voltammetric determination of aurothiomalate in urine using a screen-printed carbon electrode*, *Electroanalysis* 18 (2006) 1457–1462.
- [92] J.-C. Chen, a. S. Kumar, H.-H. Chung, S.-H. Chien, M.-C. Kuo, J.-M. Zen, *An enzymeless electrochemical sensor for the selective determination of creatinine in human urine*, *Sensors Actuators B Chem.* 115 (2006) 473–480.
- [93] R.M. Pemberton, A. Amine, J.P. Hart, *Voltammetric behavior of chlorophyll at a screen-printed carbon electrode and its potential role as a biomarker for monitoring fecal contamination*, *Anal. Lett.* 37 (2004) 1625–1643.
- [94] K.C. Honeychurch, D.M. Hawkins, J.P. Hart, D.C. Cowell, *Voltammetric behaviour and trace determination of copper at a mercury-free screen-printed carbon electrode*, *Talanta* 57 (2002) 565–574.
- [95] J.W. Dilleen, S.D. Sprules, B.J. Birch, B.G.D. Haggett, *Electrochemical determination of silver in photographic solutions using fixed-volume single-use sensors*, *Analyst* 123 (1998) 2905–2907.
- [96] S. Laschi, I. Palchetti, M. Mascini, *Gold-based screen-printed sensor for detection of trace lead*, *Sensors Actuators B Chem.* 114 (2006) 460–465.
- [97] M.F. Noh, I.E. Thotill, *Development and characterisation of disposable gold electrodes, and their use for lead(II) analysis*, *Anal. Bioanal. Chem.* 386 (2006) 2095–2106.
- [98] J.M. Zen, C.C. Yang, A.S. Kumar, *Voltammetric behavior and trace determination of Pb²⁺ at a mercury-free screen-printed silver electrode*, *Anal. Chim. Acta* 464 (2002) 229–235.
- [99] J. Wang, *Decentralized electrochemical monitoring of trace metals: from disposable strips to remote electrodes. Plenary lecture*, *Analyst* 119 (1994) 763–766.
- [100] J. Wang, B. Tian, *Screen-printed stripping voltammetric/potentiometric electrodes for decentralized testing of trace lead*, *Anal. Chem.* 13 (1992) 1706–1709.
- [101] G. Silva Nunes, G. Jeanty, J.-L. Marty, *Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes used for the detection of anticholinesterase pesticides*, *Anal. Chim. Acta* 523 (2004) 107–115.
- [102] B. Bucur, D. Fournier, A. Danet, J.-L. Marty, *Biosensors based on highly sensitive acetylcholinesterases for enhanced carbamate insecticides detection*, *Anal. Chim. Acta* 562 (2006) 115–121.
- [103] D. Ogończyk, L. Tymecki, I. Wyzkiewicz, R. Koncki, S. Glab, *Screen-printed disposable urease-based biosensors for inhibitive detection of heavy metal ions*, *Sensors Actuators B Chem.* 106 (2005) 450–454.

- [104] B.B. Rodriguez, J.A. Bolbot, I.E. Tothill, *Development of urease and glutamic dehydrogenase amperometric assay for heavy metals screening in polluted samples*, Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 1157–1167.
- [105] J.D. Newman, A.P.F. Turner, G. Marrazza, *Ink-jet printing for the fabrication of amperometric glucose biosensors*, Anal. Chim. Acta 262 (1992) 13–17.
- [106] M.A.T. Gilmartin, J.P. Hart, *Fabrication and characterization of a screen-printed, disposable, amperometric cholesterol biosensor*, Analyst 119 (1994) 2331–2336.
- [107] A.M. Azevedo, D.M.F. Prazeres, J.M.S. Cabral, L.P. Fonseca, *Ethanol biosensors based on alcohol oxidase*, Biosens. Bioelectron. 21 (2005) 235–247.
- [108] M. Boujtita, *Development of a disposable ethanol biosensor based on a chemically modified screen-printed electrode coated with alcohol oxidase for the analysis of beer*, Biosens. Bioelectron. 15 (2000) 257–263.
- [109] N.G. Patel, S. Meier, K. Cammann, G.-C. Chemnitz, *Screen-printed biosensors using different alcohol oxidases*, Sensors Actuators B Chem. 75 (2001) 101–110.
- [110] H. Kotte, B. Grunding, K.-D. Vorlop, B. Strehnitz, U. Stottmeister, *Methylphenazonium-modified enzyme sensor based on polymer thick films for subnanomolar detection of phenols*, Anal. Chem. 67 (1995) 65–70.
- [111] A. Avramescu, S. Andreescu, T. Noguer, C. Bala, D. Andreescu, J.-L. Marty, *Biosensors designed for environmental and food quality control based on screen-printed graphite electrodes with different configurations*, Anal. Bioanal. Chem. 374 (2002) 25–32.
- [112] R. Solná, P. Skládal, *Amperometric flow-injection determination of phenolic compounds using a biosensor with immobilized laccase, peroxidase and tyrosinase*, Electroanalysis 17 (2005) 2137–2146.
- [113] R.M. Pemberton, T.T. Mottram, J.P. Hart, *Development of a screen-printed carbon electrochemical immunosensor for picomolar concentrations of estradiol in human serum extracts*, J. Biochem. Biophys. Methods 63 (2005) 201–212.
- [114] D. Butler, G.G. Guilbault, *Disposable amperometric immunosensor for the detection of 17- β estradiol using screen-printed electrodes*, Sensors Actuators B Chem. 113 (2006) 692–699.
- [115] G. Volpe, G. Fares, F. delli Quadri, R. Draisci, G. Ferretti, C. Marchiafava, D. Moscone, G. Palleschi, *A disposable immunosensor for detection of 17 β -estradiol in non-extracted bovine serum*, Anal. Chim. Acta 572 (2006) 11–16.
- [116] M. Díaz-González, M.B. González-García, A. Costa-García, *Detection of pneumolysin in human urine using an immunosensor on screen-printed carbon electrodes*, Sensors Actuators B Chem. 113 (2006) 1005–1011.

- [117] M. Díaz-González, M.B. González-García, A. Costa-García, *Immunosensor for mycobacterium tuberculosis on screen-printed carbon electrodes*, Biosens. Bioelectron. 20 (2005) 2035–2043.
- [118] L. Micheli, A. Radoi, R. Guarrina, R. Massaud, C. Bala, D. Moscone, G. Palleschi, *Disposable immunosensor for the determination of domoic acid in shellfish*, Biosens. Bioelectron. 20 (2004) 190–196.
- [119] L. Micheli, R. Grecco, M. Badea, D. Moscone, G. Palleschi, *An electrochemical immunosensor for aflatoxin M1 determination in milk using screen-printed electrodes*, Biosens. Bioelectron. 21 (2005) 588–596.
- [120] H. Yu, F. Yan, Z. Dai, H. Ju, *A disposable amperometric immunosensor for alpha-1-fetoprotein based on enzyme-labeled antibody/chitosan-membrane-modified screen-printed carbon electrode*, Anal. Biochem. 331 (2004) 98–105.
- [121] J.-G. Guan, Y.-Q. Miao, J.-R. Chen, *Prussian blue modified amperometric FIA biosensor: one-step immunoassay for α -fetoprotein*, Biosens. Bioelectron. 19 (2004) 789–794.
- [122] D. Butler, M. Pravda, G.G. Guilbault, *Development of a disposable amperometric immunosensor for the detection of ecstasy and its analogues using screen-printed electrodes*, Anal. Chim. Acta 556 (2006) 333–339.
- [123] S. Susmel, G.G. Guilbault, C.K. O’Sullivan, *Demonstration of labelless detection of food pathogens using electrochemical redox probe and screen printed gold electrodes*, Biosens. Bioelectron. 18 (2003) 881–889.
- [124] DropSens, *Screen printed electrodes*, (2014). http://www.dropsens.com/en/screen_printed_electrodes_pag.html (accessed January 26, 2015).
- [125] M. Tudorache, C. Bala, *Biosensors based on screen-printing technology, and their applications in environmental and food analysis*, Anal. Bioanal. Chem. (2007).
- [126] O. Zaouak, L. Authier, C. Cugnet, A. Castetbon, M. Potin-Gautier, *Bismuth-coated screen-printed microband electrodes for on-field labile cadmium determination*, Electroanalysis 21 (2009) 689–695.
- [127] A. Mandil, A. Amine, *Screen-printed electrodes modified by bismuth film for the determination of released lead in moroccan ceramics*, Anal. Lett. 42 (2009) 1245–1257.
- [128] J.C. Quintana, F. Arduini, A. Amine, F. Punzo, G.L. Destri, C. Bianchini, D. Zane, A. Curulli, G. Palleschi, D. Moscone, *Part I: A comparative study of bismuth-modified screen-printed electrodes for lead detection.*, Anal. Chim. Acta 707 (2011) 171–7.

- [129] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Stripping analysis of heavy metals in tap water using the bismuth film electrode*, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 1365–1369.
- [130] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: influence of concentration range and deposition parameters*, Electrochim. Acta 53 (2008) 6616–6622.
- [131] L. Lin, N.S. Lawrence, S. Thongngamdee, J. Wang, Y. Lin, *Catalytic adsorptive stripping determination of trace chromium (VI) at the bismuth film electrode*, Talanta 65 (2005) 144–148.
- [132] N. Malakhova, N. Stojko, K. Brainina, *Novel approach to bismuth modifying procedure for voltammetric thick film carbon containing electrodes*, Electrochem. Commun. 9 (2007) 221–227.
- [133] M.Á. Granado Rico, M. Olivares-Marín, E.P. Gil, *A novel cell design for the improved stripping voltammetric detection of Zn(II), Cd(II), and Pb(II) on commercial screen-printed strips by bismuth codeposition in stirred solutions*, Electroanalysis 20 (2008) 2608–2613.
- [134] H.-L. Fang, H.-X. Zheng, M.-Y. Ou, Q. Meng, D.-H. Fan, W. Wang, *One-step sensing lead in surface waters with screen printed electrode*, Sensors Actuators B Chem. 153 (2011) 369–372.
- [135] Z. Nie, C.A. Nijhuis, J. Gong, X. Chen, A. Kumachev, A.W. Martinez, M. Narovlyansky, G. Whitesides, *Electrochemical sensing in paper-based microfluidic devices*, Lab Chip 10 (2010) 477–483.
- [136] I. Svancara, R. Metelka, M. Stiburkova, G. Jansova, J. Seidlova, K. Vytras, B. Pihlar, *Carbon paste electrodes and screen-printed sensors plated with mercury and bismuth films in stripping voltammetry of heavy metals*, Sci. Pap. Univ. Pardubice. Ser. A. Fac. Chem. Technol. 8 (2002) 19–33.
- [137] N. Wongkaew, C. Guajardo, P. Rijiravanich, M. Somasundrum, W. Surareungchai, *Use of 3-D plots to avoid mutual interference in bianalyte ASV determinations: application to cadmium and lead detection*, Talanta 85 (2011) 1225–1228.
- [138] S. Chuanuwatanakul, W. Dungchai, O. Chailapakul, S. Motomizu, *Determination of trace heavy metals by sequential injection-anodic stripping voltammetry using bismuth film screen-printed printed carbon electrode*, Anal. Sci. 24 (2008) 589–594.
- [139] M. Li, D.-W. Li, Y.-T. Li, D.-K. Xu, Y.-T. Long, *Highly selective in situ metal ion determination by hybrid electrochemical “adsorption-desorption” and colorimetric methods*, Anal. Chim. Acta 701 (2011) 157–163.

- [140] M. Khairy, R.O. Kadara, D.K. Kampouris, C.E. Banks, *In situ bismuth film modified screen printed electrodes for the bio-monitoring of cadmium in oral (saliva) fluid*, Anal. Methods 2 (2010) 645–649.
- [141] C. Henríquez, L.M. Laglera, M.J. Alpizar, J. Calvo, F. Arduini, V. Cerdà, *Cadmium determination in natural water samples with an automatic multisyringe flow injection system coupled to a flow-through screen printed electrode*, Talanta 96 (2012) 140–146.
- [142] J. Calvo Quintana, F. Arduini, A. Amine, K. van Velzen, G. Palleschi, D. Moscone, *Part two: Analytical optimisation of a procedure for lead detection in milk by means of bismuth-modified screen-printed electrodes*, Anal. Chim. Acta 736 (2012) 92–99.
- [143] N. Lezi, A. Economou, P.A. Dimovasilis, P.N. Trikalitis, M.I. Prodromidis, *Disposable screen-printed sensors modified with bismuth precursor compounds for the rapid voltammetric screening of trace Pb(II) and Cd(II)*, Anal. Chim. Acta 728 (2012) 1–8.
- [144] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Ex situ deposited bismuth film on screen-printed carbon electrode: a disposable device for stripping voltammetry of heavy metal ions*, Electroanalysis 22 (2010) 1460–1467.
- [145] R.O. Kadara, N. Jenkinson, C.E. Banks, *Disposable bismuth oxide screen printed electrodes for the high throughput screening of heavy metals*, Electroanalysis 21 (2009) 2410–2414.
- [146] G.-H. Hwang, W.-K. Han, J.-S. Park, S.-G. Kang, *An electrochemical sensor based on the reduction of screen-printed bismuth oxide for the determination of trace lead and cadmium*, Sensors Actuators B Chem. 135 (2008) 309–316.
- [147] R.O. Kadara, I.E. Tothill, *Development of disposable bulk-modified screen-printed electrode based on bismuth oxide for stripping chronopotentiometric analysis of lead (II) and cadmium (II) in soil and water samples*, Anal. Chim. Acta 623 (2008) 76–81.
- [148] R. Pauliukaite, R. Metelka, I. Svancara, A. Krolicka, A. Bobrowski, E. Norkus, K. Kalcher, K. Vytras, *Screen-printed carbon electrodes bulk-modified with Bi_2O_3 or Sb_2O_3 for trace determination of some heavy metals*, Sci. Pap. Univ. Pardubice. Ser. A. 10 (2004) 47–58.
- [149] M. Khairy, R.O. Kadara, D.K. Kampouris, C.E. Banks, *Disposable bismuth oxide screen printed electrodes for the sensing of zinc in seawater*, Electroanalysis 22 (2010) 1455–1459.
- [150] C. Kokkinos, A. Economou, I. Raptis, C. Efstathiou, T. Speliotis, *Novel disposable bismuth-sputtered electrodes for the determination of trace metals by stripping voltammetry*, Electrochem. Commun. 9 (2007) 2795–2800.

- [151] X. Niu, H. Zhao, M. Lan, *Disposable screen-printed antimony film electrode modified with carbon nanotubes/ionic liquid for electrochemical stripping measurement*, *Electrochim. Acta* 56 (2011) 9921–9925.
- [152] C. Chen, X. Niu, Y. Chai, H. Zhao, M. Lan, Y. Zhu, G. Wei, *Determination of lead(II) using screen-printed bismuth-antimony film electrode*, *Electroanalysis* 25 (2013) 1446–1452.
- [153] P. Zuman, *Role of mercury electrodes in contemporary analytical chemistry*, *Electroanalysis* 12 (2000) 1187–1194.
- [154] J. Barek, J. Zima, *Eighty years of polarography-history and future*, *Electroanalysis* 15 (2003) 5–6.
- [155] R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, *Simultaneous analysis of several spectroscopic titrations with self-modeling curve resolution*, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 18 (1993) 293–300.
- [156] J. Díaz-Cruz, R. Tauler, B.S. Grabarić, M. Esteban, E. Casassas, *Application of multivariate curve resolution to voltammetric data. Part I. Study of Zn(II) complexation with some polyelectrolytes*, *J. Electroanal. Chem.* 393 (1995) 7–16.
- [157] R. Tauler, A. Smilde, B. Kowalski, *Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution*, *J. Chemom.* 9 (1995) 31–58.
- [158] E.R. Malinowski, *Factor analysis in chemistry*, 3rd ed., John Wiley & Sons, New York, 2002.
- [159] M.J. Lopez, C. Ariño, R. Tauler, M. Esteban, *Voltammetry assisted by multivariate analysis as a tool for speciation of metallothioneins: competitive complexation of α - and β -metallothionein domains with cadmium and zinc*, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5609–5616.
- [160] A. de Juan, Y. Vander Heyden, R. Tauler, D.L. Massart, *Assessment of new constraints applied to the alternating least squares method*, *Anal. Chim. Acta* 346 (1997) 307–318.
- [161] J. Mendieta, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Application of multivariate curve resolution to voltammetric data. II. Study of metal-binding properties of the peptides*, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 134–141.
- [162] J.M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M.S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *Implementation of a chemical equilibrium constraint in the multivariate curve resolution of voltammograms from systems with successive metal complexes*, *Analyst* 126 (2001) 371–377.
- [163] A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems*, *Analyst* 133 (2008) 112–125.

- [164] A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Combined use of the potential shift correction and the simultaneous treatment of spectroscopic and electrochemical data by multivariate curve resolution: analysis of a Pb(II)-phytochelatin system*, Analyst 133 (2008) 470–477.
- [165] J.M. Díaz Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño, M. Esteban, *Non-linear multivariate curve resolution analysis of voltammetric pH titrations*, Analyst 135 (2010) 1653–1662.
- [166] S. Cavanillas, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: a new multivariate curve resolution method for non-bilinear voltammetric measurements*, Anal. Chim. Acta 689 (2011) 198–205.
- [167] M. Mathworks Inc. Natick, *Matlab*, (2008).
- [168] A. Alberich, N. Serrano, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Bismuth film electrodes for the study of metal thiolate complexation: an alternative to mercury electrodes*, Talanta 78 (2009) 1017–1022.
- [169] M.S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, *Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data*, J. Inorg. Biochem. 66 (1997) 29–36.

Agradecimientos

A la Universidad de El Salvador y a la Fundación Carolina, por la beca que me ha permitido realizar otra etapa profesional.

A mis directoras de tesis, la Dra. Cristina Ariño y la Dra. Núria Serrano, por su implicación en la dirección de esta tesis, ya que sin duda alguna su orientación, manera de trabajar y persistencia han sido fundamentales en el desarrollo y finalización de esta tesis.

Al Dr. José Manuel Díaz-Cruz, por compartir su conocimiento científico, y por su siempre plena disposición en colaborar cuando solicité su ayuda para solventar dudas y problemas que se presentaron durante la etapa investigativa.

Al Dr. Miquel Esteban, por darme la oportunidad de formarme en el área de electroanálisis, que al principio me pareció complicada, pero que termino despertándome el gusto por el mundo de electroanálisis y los electrodos serigrafiados.

Quisiera agradecer de manera especial al Dr. Néstor Orellana, por su valiosa ayuda en las gestiones administrativas que implicaron mi beca de doctorado y mi estancia en Barcelona, y que gracias a su buena voluntad y diligencia, permitió que mi estancia en esta ciudad se desarrollara sin ningún tipo de contratiempo.

Así también, agradecer a María Esperanza Herrera, por su valiosa ayuda, en todo tipo de gestión personal, que permitió que la estancia fuera de mi país pasara sin incidentes. A Karina Cuchilla, a Roselia Paredes, a Orlando Canjura y a Damaris Herrera por estar dispuestos a arriesgarse firmando como fiadores para el contrato de mi beca, y digo arriesgarse porque viviendo en una ciudad como Barcelona es fácil cautivarse y acariciara la idea de vivir por siempre en ella.

A mis compañeros de grupo de Electroanálisis presentes y pasados, a todos ellos por los buenos momentos compartidos, en especial a Santiago Cavanillas por acogerme desde el primer día en el grupo y por su apoyo. A Cristian Barceló por ser un excelente compañero de trabajo.

A los compañeros presentes y pasados del Departamento de Química Analítica, en especial a los chicos y chicas QÜESTRAM dispuestos siempre a brindar su ayuda cuando se les solicita, en especial a Edith Nataren y Gema Ortega por su compañía y por los buenos momentos compartidos, a Gema por acogerme, sin duda alguna su compañía y solidaridad hizo más agradable mi estancia en el departamento. A Gina Cárdenas y a Eloy Companio por las agradables reuniones.

Por otro lado, no puedo dejar de agradecer a toda la gente bella que he conocido durante mi estancia en esta ciudad, la “ONU” de Barcelona. A Jackeline Varas, por los buenos momentos y por su compañía durante estos años. A Norma Falconi y Enrique Mosquera, por compartir y celebrar esos días importantes en los que se siente la ausencia de la familia, a Norma por introducirme a ese mundo multicultural que invita a ser solidario con el prójimo, a Enrique por mostrarme lo bello de Catalunya y España, que aún no termino de conocer por que siempre hay más cosas que ver, más comida y buenos vinos que probar, al escuchar a Enrique hablar sobre su país, me doy cuenta que me quedan muchas cosas pendientes que ver en España. A mi querida amiga Katya Lapchak por estar siempre presente y por hacerme reír con sus ocurrencias y a Magaly Onofre por los buenos momentos compartidos.

Finalmente agradecer a mis queridos padres, por su apoyo imprescindible durante todas las etapas de mi vida, a mis hermanos y a mi querida sobrina Georgina, que me alegra el día con solo escucharle contar un cuento.

