



Nuevas estrategias electroanalíticas y quimiométricas aplicadas a sistemas de difícil resolución. Complejación de fitoquelatinas con plomo

Arístides Alberich Herranz

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) 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. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (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) 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. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (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 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 neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This 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.



Nuevas estrategias electroanalíticas y quimiométricas aplicadas a sistemas de difícil resolución. Complejación de fitoquelatinas con plomo

Arístides Alberich Herranz



Departament de Química Analítica
Barcelona, 2010



Departament de Química Analítica

**Nuevas estrategias electroanalíticas y
quimiométricas aplicadas a sistemas de
difícil resolución. Complejación de
fitoquelatinas con plomo**

Memoria presentada por
Arístides Alberich Herranz
para optar al grado de
Doctor por la Universitat de Barcelona

Dirección

Dra. Cristina Ariño Blasco

Dr. José Manuel Díaz Cruz

Programa de doctorado

Química Analítica del Medi Ambient i de la Pol·lució (Bienni 2003-2005)

Memoria presentada por Arístides Alberich Herranz
para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona.

Nuevas estrategias electroanalíticas y quimiométricas aplicadas a sistemas de difícil resolución. Complejación de fitoquelatinas con plomo

La Dra. Cristina Ariño Blasco y el Dr. José Manuel Díaz Cruz,

CERTIFICAN

que la presente tesis doctoral, titulada “*Nuevas estrategias electroanalíticas y quimiométricas aplicadas a sistemas de difícil resolución. Complejación de fitoquelatinas con plomo*”, ha sido realizada por Arístides Alberich Herranz bajo nuestra dirección en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Diciembre de 2010

Dra. Cristina Ariño Blasco

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

Dr. José Manuel Díaz Cruz

Profesor titular del Departament de Química
Analítica de la Universitat de Barcelona

A mis padres, por todo su Amor

Pero me engañé también esta vez y caí en el lago, hundiéndome hasta el cuello. Allí habría perecido irremisiblemente, si con la fuerza de mi propio brazo no hubiera tirado de mi coleta hacia arriba, sacándome a mí y a mi caballo, al que estrechaba fuertemente entre mis piernas.

Índice

Objetivos	xv
Estructura y contenidos de la memoria	xvii
I. INTRODUCCIÓN	1
1. El plomo, un tóxico global	5
1.1. Evolución histórica, usos actuales y sostenibilidad	
1.2. Fuentes de contaminación y ciclo biogeoquímico	
1.3. Biodisponibilidad	
1.4. Toxicidad	
1.4.1. Neurotoxicidad e impacto sobre la capacidad de aprendizaje	
2. Fitorremediación del plomo	16
2.1. Aspectos generales de las fitorremediación	
2.2. Eficiencia de la fitorremediación del plomo	
2.2.1. Movilización	
2.2.2. Absorción	
2.2.3. Transposición	
2.2.4. Distribución y almacenamiento	
2.3. Fitoquelatinas	
2.3.1. Estructura	

- 2.3.2. Biosíntesis
- 2.3.3. Mecanismo de actuación

Referencias I	31
II. DETERMINACIÓN DE MODELOS DE COMPLEJACIÓN	37
3. Valoraciones con fitoquelatinas sintéticas	43
4. MCR-ALS aplicado a valoraciones voltamperométricas	46
4.1. Aplicación de la voltamperometría a los estudios de complejación	
4.2. <i>Hard modelling</i> y <i>soft modelling</i>	
4.3. Análisis quimiométrico de sistemas multicomponente	
5. Problemas de los sistemas PC/Pb(II)	54
5.1. Señales anódicas	
5.2. Solapamiento de señales	
5.3. Pérdida de linealidad	
Referencias II	60
III. METODOLOGÍA APLICADA	63
6. Técnicas instrumentales	67
6.1. Voltamperometría	
6.1.1. Voltamperometría diferencial de impulsos	
6.2. Técnicas de redisolución	
6.2.1. Voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos	
6.2.2. Cronopotenciometría de redisolución a corriente constante	
6.3. Dicroísmo circular	
7. Electrodo de trabajo	76
7.1. Electrodo de gotas de mercurio	

7.2. Electrodo de película de bismuto

8. Técnicas quimiométricas 81

8.1. Resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados

8.2. Modelado blando de las valoraciones complexométricas

8.2.1. Creación de la matriz de datos

8.2.2. Suavizado de las medidas y corrección de la línea base

8.2.3. Estimación del número de componentes

8.2.4. Generación de la estimación inicial

8.2.5. Restricciones

8.3. Análisis simultáneo de varios experimentos por MCR-ALS

Referencias III 92

IV. EXPERIMENTAL 95

9. Instrumentación y reactivos 97

9.1. Instrumentación

9.2. Reactivos y disoluciones

10. Procedimientos experimentales 103

10.1. Valoraciones por voltamperometría diferencial de impulsos

10.2. Preparación del electrodo BiFE-CG

10.2.1. Pulido del carbono vitrificado

10.2.2. Obtención de la película de bismuto

10.3. Valoraciones por difracción circular

10.3.1. Optimización de las sustancias y sus concentraciones

10.3.2. Procedimiento experimental

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 111

11. Presentación de resultados 113

11.1. Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-Phytochelatin systems

- 11.2. Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy
- 11.3. Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems
- 11.4. Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: Influence of concentration range and deposition parameters
- 11.5. 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
- 11.6. Comparative study of metal complexation by thiol-rich peptides using bismuth film and mercury drop electrodes

12. Discusión de resultados

193

- 12.1. Problemas del estudio MCR-ALS de valoraciones PC/Pb(II) utilizando un SMDE
- 12.2. Nuevas herramientas y metodologías: exposición y aplicación a sistemas con Cd(II) y Zn(II)
 - 12.2.1. Análisis MCR-ALS de matrices espectro-voltamperométricas
 - 12.2.2. Corrección del desplazamiento de potenciales mediante el programa *shiftfit*
 - 12.2.3. Electrodo de película de bismuto
- 12.3. Nuevas herramientas y metodologías: aplicación a sistemas con Pb(II)
 - 12.3.1. Estudio del sistema PC₃/Pb(II) aplicando *shiftfit* y análisis MCR-ALS de matrices DPP-CD
 - 12.3.2. Sistema PC₃/Pb(II): diferencias entre los resultados de los artículos 11.1 y 11.5
 - 12.3.3. Estudio del sistema GSH/Pb(II) con un electrodo de película de bismuto

Referencias V

233

VI. CONCLUSIONES

235

Formulación del programa <i>Shiftfit</i>	243
Abreviaturas	247
Agradecimientos	251

Objetivos

La fitorremediación es una técnica de descontaminación que aprovecha la capacidad de las plantas de acumular sustancias tóxicas sin que afecten severamente a su ciclo vital. De esta forma, se remedian ecosistemas contaminados con un bajo impacto medioambiental, convirtiéndose en una alternativa a los métodos clásicos, más agresivos y costosos. En lo referente a metales pesados, las plantas inducen la síntesis intracelular de fitoquelatinas, ligandos tiólicos que complejan los metales y los almacenan en orgánulos celulares de bajo metabolismo como las vacuolas, donde dejan de ser tóxicos para la planta.

A pesar de las investigaciones realizadas hasta la fecha, el mecanismo de actuación de las fitoquelatinas no está totalmente establecido, incluida la secuencia de formación y estequiometría final de los complejos PC-M. Por esta razón, resulta de gran interés estudiar estos procesos de complejación, pues sus conclusiones pueden ayudar a entender la fitorremediación y a optimizar su aplicación.

La presente tesis doctoral se plantea como una nueva etapa en la línea de investigación del grupo de Electroanálisis dedicada a la complejación de metales pesados especialmente nocivos por fitoquelatinas sintéticas y ligandos relacionados. Estas investigaciones se sustentan -como metodología básica- en el análisis quimiométrico mediante MCR-ALS de los datos obtenidos de valoraciones complexométricas registradas por técnicas electroanalíticas, concluyendo con la proposición de modelos de complejación para el sistema en estudio.

La elección del plomo como metal complejante se debe a su alta toxicidad y dispersión en el medio ambiente, así como por suponer un paso más en el uso de dicha metodología, pues los sistemas PC/Pb(II) presentan problemas que la dificultan. Estos problemas son, principalmente, el desplazamiento lateral de las señales voltamperométricas que produce un decrecimiento en la linealidad de los datos obtenidos, y la presencia de señales anódicas que favorece un fuerte solapamiento entre los picos de las diferentes especies químicas; ambos problemas comprometen la aplicación del método MCR-ALS y el correcto examen de los resultados.

El objetivo de esta tesis adquiere así una doble vertiente. Por un lado, para solucionar dichos problemas y, de alguna forma, ampliar la aplicabilidad de MCR-ALS a eventuales sistemas más complejos, se estudian nuevas adaptaciones metodológicas (análisis MCR-ALS de matrices espectro-voltamperométricas), herramientas (programa *shiftfit*, que corrige el desplazamiento de potencial de las señales voltamperométricas) y metodologías experimentales (uso de electrodos alternativos al de mercurio). Por otro lado, se procura la consecución de resultados para los propios sistemas PC/Pb(II) estudiados, es decir, la determinación de modelos de complejación lo bastante completos y sólidos para servir de apoyo a los resultados de los estudios *in vivo* o *in vitro*.

Estructura y contenidos de la memoria

La idea central de esta tesis doctoral es el estudio de la complejación del plomo por fitoquelatinas y, por tanto, la primera parte de la memoria (**I. Introducción**) está dedicada a la significación que pueda tener investigar sobre este tema. En el capítulo 1 se exponen los diferentes aspectos que conforman la realidad del plomo como un tóxico muy peligroso para el medio ambiente y la población, tanto por su toxicidad como por su ubicuidad. En el segundo capítulo se detalla la importancia actual de la fitorremediación y las etapas de este proceso dentro de la planta, así como el papel que juegan las fitoquelatinas en la descontaminación de metales pesados.

El método de partida utilizado para estudiar la complejación de PC consiste en realizar valoraciones que se siguen por voltamperometría, y cuyos resultados se analizan mediante MCR-ALS. Los fundamentos de esta metodología están recogidos en la segunda parte de la memoria (**II. Determinación de modelos de complejación**), donde también se dedica el capítulo 5 a exponer los problemas adicionales que supone el estudio de sistemas con plomo, el susodicho fuerte solapamiento entre señales y la pérdida de linealidad de los datos experimentales.

En la tercera parte (**III. Metodología aplicada**) se explica con más detalle las técnicas instrumentales, quimiométricas y los electrodos de trabajo empleados como base para las nuevas herramientas propuestas. En la cuarta parte (**IV. Experimental**) se repasan la instrumentación, reactivos y procedimientos empleados.

Los trabajos publicados (capítulo 11) y la explicación de los resultados obtenidos (capítulo 12) se disponen en la quinta parte de la memoria (**V. Resultados y discusión**).

Aunque agrupados en un único capítulo, la exposición de estos resultados se organiza en tres bloques:

- El primer bloque se basa en el artículo 11.1, que recoge la primera aproximación utilizando la metodología básica al estudio de la complejación de fitoquelatinas y ligandos relacionados con plomo. Los resultados (**12.1**) ponen de relieve la relativa solvencia del análisis de datos polarográficos mediante MCR-ALS para proponer modelos de complejación, así como el verdadero alcance de los problemas que ya se describían en el capítulo 5.
- El segundo bloque recopila los resultados (**12.2**) de la aplicación de las nuevas metodologías y herramientas propuestas para solucionar las insuficiencias o ambigüedades de los modelos de complejación obtenidos en el artículo anterior. Estas metodologías son el análisis quimiométrico conjunto de valoraciones registradas por polarografía y dicroísmo circular (artículo 11.2), la formulación del programa *shiftfit* que corrige el movimiento lateral de señales polarográficas, es decir, la falta de un valor fijo del potencial de pico (artículo 11.3) y, finalmente, el uso del electrodo de película de bismuto con la intención de minimizar el solapamiento que producen las señales anódicas (artículo 11.4).
- Tras la aplicación de estas metodologías a sistemas sencillos, en el tercer bloque se aplican a sistemas con plomo (artículos 11.5 y 11.6). Dentro de la discusión de resultados (**12.3**), incluimos un apartado dedicado a comparar los diferentes modelos de complejación obtenidos en los artículos 11.1 y 11.5 para el sistema $\text{PC}_3/\text{Pb(II)}$.

Los trabajos presentados en la memoria de la tesis son:

- 1- *Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-Phytochelatin systems.*

Autores: A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban.

Talanta 71 (2007) 344-352.

- 2- *Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy.*
Autores: A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban.
Analytica Chimica Acta 584 (2007) 403-409.

- 3- *Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems.*
Autores: A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.
The Analyst 133 (2008) 112-125

- 4- *Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: Influence of concentration range and deposition parameters.*
Autores: N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.
Electrochimica Acta 53 (2008) 6616-6622.

- 5- *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.*
Autores: A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.
The Analyst 133 (2008) 470-477.

- 6- *Comparative study of metal complexation by thiol-rich peptides using bismuth film and mercury drop electrodes.*
Autores: A. Alberich, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban.
Talanta 78 (2009) 1017-1022.

Parte I

INTRODUCCIÓN

I.

La agencia estadounidense para el registro de sustancias tóxicas y enfermedades (ATSDR) elabora de forma bianual una lista prioritaria de sustancias tóxicas que se utiliza como guía para legislar sobre protección medioambiental. Esta lista se basa no sólo en la toxicidad inherente de cada sustancia química, sino también en su concentración en el medio ambiente y en el nivel de exposición de la población. En la última lista publicada [1], cuatro de los siete primeros puestos son metales pesados (ocupando el plomo el segundo lugar), lo que da idea del alcance y peligrosidad de estos tóxicos para la humanidad.

El modo más seguro de protegernos de los múltiples efectos adversos del plomo es limitar su entrada en la cadena alimentaria desde sus niveles tróficos elementales. Para conseguirlo, es necesario descontaminar los biotopos más afectados, pero los métodos tradicionales de ingeniería civil basados en extraer o simplemente inmovilizar tóxicos son muchas veces laboriosos, caros e incluso agresivos con el medio ambiente.

No es este el caso de la biorremediación, técnica que aprovecha la capacidad de determinados seres vivos (bacterias, hongos y plantas) para extraer del medio o degradar enzimáticamente tóxicos como metales pesados, radionúclidos, disolventes orgánicos, pesticidas, explosivos, hidrocarburos poliaromáticos, etcétera.

Los primeros estudios realizados por George M. Robinson sobre biorremediación datan de la década de los sesenta; más tarde, se utilizaron microorganismos para degradar compuestos organoclorados y organofosforados, aunque el impulso definitivo (y mediático) se da en 1989 con la etapa final de limpieza del vertido de crudo del petrolero Exxon Valdez en Alaska [2]. Actualmente, el espectro de tóxicos tratables se ha ampliado mediante la búsqueda y creación en laboratorio de bacterias, enzimas o levaduras específicas, pero en el campo de los metales pesados el éxito es tan sólo parcial al ser tóxicos que difícilmente pasan a formas poco nocivas. Así pues, el uso de plantas para descontaminar ecosistemas de metales pesados -esto es, la técnica de la fitorremediación- parece la opción más indicada.

1

El plomo, un tóxico global

1.1. Evolución histórica, usos actuales y sostenibilidad

El plomo fue uno de los primeros metales en ser utilizado por el hombre, y ya en la Edad Antigua se obtenía fácilmente por reducción de sus óxidos con carbón a temperaturas relativamente bajas. Estos óxidos provenían de la galena (PbS) que se convertía en óxido tostándola al aire, aunque también se podía obtener plomo directamente con agentes reductores como el hierro o el cobre.

Lo asequible de su obtención y sus características únicas (altísima densidad, maleabilidad, ductilidad y resistencia a la corrosión, junto con su aspecto blanco azulado sin brillo, poco vistoso) hicieron que el plomo se utilizara en las primeras civilizaciones principalmente como material estructural e impermeable en edificios. Se cree que el suelo de los Jardines colgantes de Semíramis en Babilonia estaba hecho de plomo para retener la humedad del suelo.

El primer pico de producción de plomo tuvo lugar durante el periodo romano (500 a.C. - 500 d.C.) ya que siguió utilizándose en construcción, así como en canalización del agua, utillaje de cocina, cosmética (acetato para oscurecer el pelo y carbonato para tapar imperfecciones de la piel), aditivo para el vino como edulcorante y bactericida, pigmento para pinturas y un largo etcétera. Algunos historiadores han sugerido que un contacto tan íntimo con esta neurotoxina pudo haber contribuido a la demencia que afectó a muchos emperadores y, por lo tanto, a la caída del imperio romano [3].

Durante la Edad Media la extracción del plomo disminuyó considerablemente y no comenzó a crecer paulatinamente hasta la revolución industrial. En el pasado siglo se encontraron nuevos usos que hicieron crecer exponencialmente la demanda de plomo, sobre todo debido a la industria automovilística. Así, en la década de los 30 ya era habitual sustituir los costosos hidrocarburos de cadena ramificada por tetrametilo y tetraetilo de plomo para incrementar el índice de octano de la gasolina.

Actualmente el plomo es, con mucho, el metal pesado más utilizado industrialmente y el cuarto metal no férreo más importante en producción después del aluminio, cobre y zinc. Los principales usos del plomo y sus compuestos hoy en día son:

- *Baterías y acumuladores*: no sólo como sistema de arranque en vehículos a motor, sino también como batería de tracción en vehículos eléctricos y como fuente eléctrica de emergencia en ordenadores, sistemas de telecomunicación, hospitales, etc. Suele ser también el acumulador habitual en sistemas generadores de energía renovable. Las posibles alternativas son, hoy por hoy, bastante más costosas y en algún caso de toxicidad no menor.
- *Construcción*: como plancha impermeable y antidesplomos en tejados; también en tuberías para la industria química, pues para uso doméstico están prohibidas.
- *Cubiertas para el cableado*: en declive, sigue siendo imprescindible para medios marinos por su alta resistencia a la corrosión.
- *Protectores de la radiación*: en hospitales, clínicas dentales y centrales nucleares; también es el material de los contenedores para residuos radioactivos en cementerios nucleares.
- *Munición*: En toda clase de munición; en lo referente a la caza y dada la creciente preocupación por el plumbismo en aves, existen perdigones de bismuto y estaño para la caza en lugares con especies protegidas.
- *Soldadura*: aleado con estaño, se utiliza en industria electrónica, aunque su uso comienza a reemplazarse por resinas conductoras.
- *Pigmentos y otros aditivos*: prohibidos para la mayoría de usos, su aplicación ha quedado restringida a revestimientos de protección, restauración de obras

artísticas, cristales protectores de la radiación, tubos de rayos catódicos y mejora de las características de algunos plásticos.

- *Gasolina con plomo*: utilizada universalmente durante décadas, en la actualidad está prohibida en muchos países ya que es la principal fuente de emisión de plomo al medio ambiente.

Como se deduce de esta lista, los usos que conllevan una naturaleza dispersiva del plomo han sido eliminados o drásticamente reducidos debido a su significación medioambiental desproporcionada. Así, este hecho y las constantes innovaciones tecnológicas han supuesto un cambio en los patrones de uso del plomo durante las últimas décadas, como se puede ver en la figura 1.

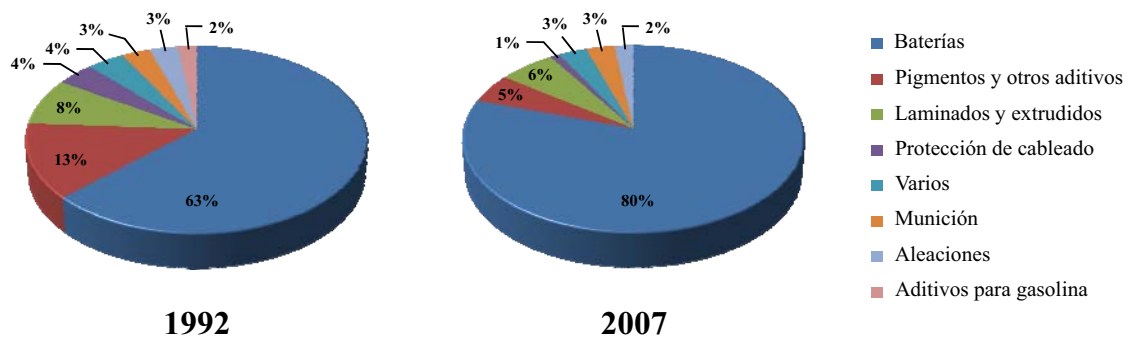


Figura 1. Aplicaciones del plomo en 1992 y 2007.

Fuente: International Lead and Zinc Study Group, cuyos países miembros suponen más del 80% del consumo global de plomo.

Se estima que las reservas mundiales de plomo son 65 millones de toneladas. Esto permitiría -asumiendo el ritmo actual de extracción- menos de 30 años de producción [4], lapso de tiempo demasiado pequeño para que los avances tecnológicos permitan al hombre el modo de vida deseado sin plomo como materia prima. Así, el futuro depende en gran medida del alcance de su producción vía reciclaje, proceso que se lleva a cabo fundiéndolo y eliminando las impurezas repetidas veces hasta que el producto final (llamado plomo secundario) es indistinguible del plomo proveniente del mineral (plomo primario). La tendencia actual es a utilizar el mayor porcentaje posible de plomo secundario; de hecho, la producción actual de plomo reciclado predomina sobre la de

plomo primario (fig. 2), y en países como Estados Unidos supera el 75% de la producción total.

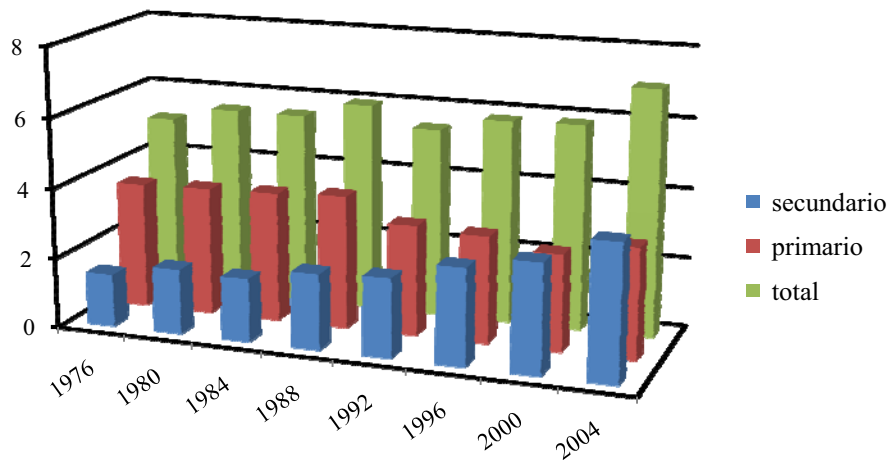


Figura 2. Producción mundial en millones de toneladas de plomo primario y secundario.

Fuente: World Bureau of Metal Statistics.

La sostenibilidad del plomo como materia prima está favorecida por diversos hechos, entre ellos:

- i)* El reciclaje es económicamente viable pues la energía requerida para la producción de plomo secundario es aproximadamente una cuarta parte de la requerida para la producción de plomo primario.
- ii)* Se considera que más del 90% del plomo utilizado es susceptible de ser reciclado ya que las aplicaciones dispersivas han sido drásticamente reducidas.
- iii)* Se comienza a apoyar el reciclaje desde organismos legislativos, al menos en los países más desarrollados.

1.2. Fuentes de contaminación y ciclo biogeoquímico

El plomo se encontraba de forma primigenia en todas las rocas y suelos del planeta en una concentración media de 16 ppm, así como en el agua y en el aire, aunque en una cantidad bastante menor [5]. Sin embargo, el uso tan extendido del plomo y su gran

persistencia en el medio ambiente hacen que actualmente sus niveles naturales hayan dejado de existir en cualquier lugar de la Tierra.

En la actualidad, prácticamente agotado el uso dispersivo del plomo y siendo el reciclaje la gestión mayoritaria al final de su vida útil, quedan como principales fuentes antropogénicas de plomo las relacionadas con su producción. Concretamente, las dos mayores fuentes de emisiones son los procesos extractivos (minas) y de manufacturación (fundiciones y refinerías), aunque también ambas cuentan con procedimientos que minimizan considerablemente sus efectos contaminantes. Así, los residuos mineros contienen un porcentaje de plomo cada vez menor gracias a métodos de extracción más eficientes y, además, se acaban enterrando bajo una capa de suelo limpio que evita su transferencia al aire. En cuanto a la industria, el plomo en forma de vapor que se desprende es recogido por un gas limpiador, al modo de los tóxicos producidos en incineradoras que destruyen residuos difíciles de reciclar. Existen también otras fuentes antropogénicas cuya cantidad total de plomo emitido es comparativamente más baja, pero cuya contaminación es peligrosa debido a su alta localización. Un ejemplo podrían ser los suelos de campos frutales rociados con arseniato de plomo (PbHAsO_4), un plaguicida de uso comercial. [6].

Las fuentes naturales de contaminación se consideran despreciables frente a las emisiones procedentes de la actividad humana, exceptuando tal vez las erupciones volcánicas, puesto que ocurren de forma muy concreta en tiempo y lugar.

Los diferentes movimientos que sigue el plomo a través del planeta conforman su ciclo biogeoquímico (fig. 3). Estos flujos vienen dados por procesos físicos como la adsorción, difusión, convección, etc.; químicos como la oxidación, hidrólisis, fotólisis, etc.; geográficos como el transporte, precipitación, erosión, etc; y la actividad biológica de los organismos participantes del ciclo.

Un ejemplo elocuente de porqué la contaminación de plomo se considera global lo encontramos en el uso de la gasolina. Por una parte, se calcula que su combustión entre 1923 y 1986 -y sólo en los Estados Unidos- dispersó cuatro millones de toneladas de Pb(II) a la atmósfera [7]; y por otra, únicamente el 10% del plomo emitido por el tráfico rodado se deposita en las inmediaciones (100 m) de la fuente, mientras el resto queda en un radio de 20 km (45%), de 20 a 200 km (10%), o bien se transporta a largas distancias por los sistemas de circulación atmosféricos [8].

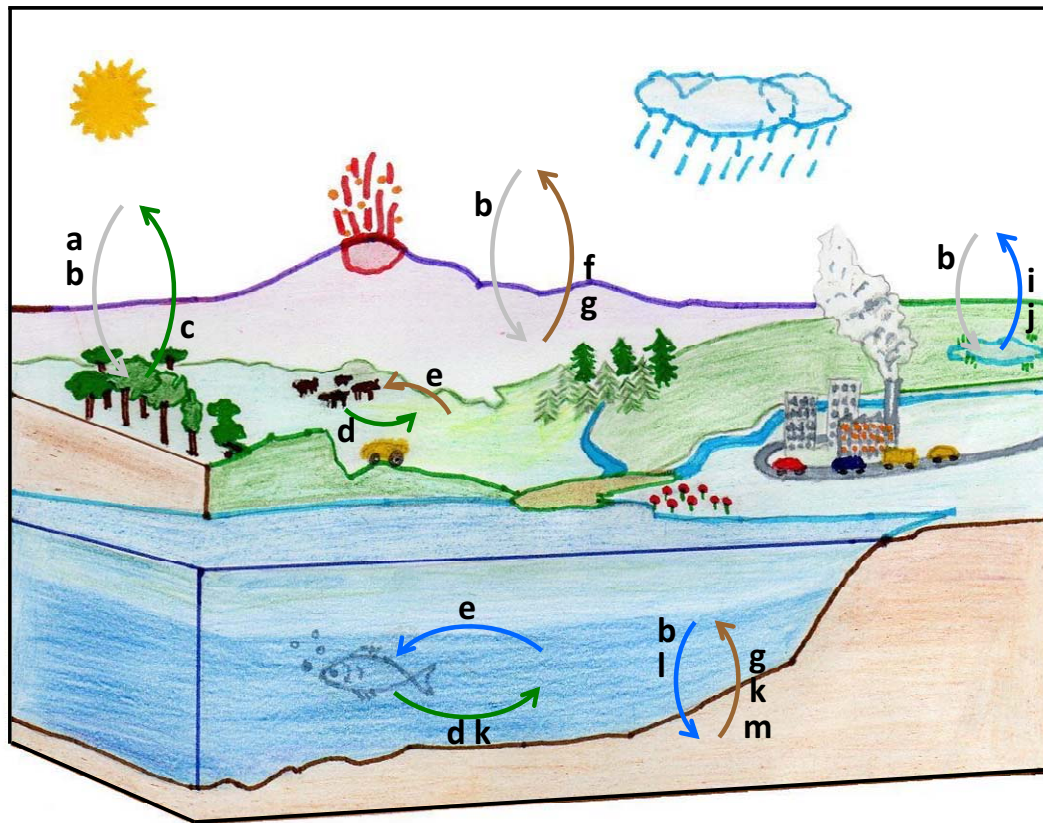


Figura 3. Ciclo biogeoquímico del plomo.

a: inhalación; **b:** precipitación/deposición; **c:** evapotranspiración; **d:** degradación; **e:** absorción/adsorción **f:** actividad volcánica; **g:** desgaste mecánico (erosión, meteorización...); **i:** evaporación; **j:** aerosol **k:** disolución; **l:** mineralización; **m:** lixiviación.

Para acabar este punto, es importante hacer notar que la lucha eficaz por reducir el impacto medioambiental del plomo se está viendo alterada por algunos países emergentes, cuyos parques automovilísticos experimentan un crecimiento exponencial. Tampoco la situación es muy satisfactoria en España, país que ocupa dentro de la Europa comunitaria el primer o segundo lugar -según fuentes consultadas- en emisiones de plomo al aire [9, 10].

1. 3. Biodisponibilidad

El concepto de biodisponibilidad de una sustancia química se refiere a la proporción de esa sustancia susceptible de dissociarse del medio ambiente para quedar accesible por

absorción a los organismos vivos. En el caso del plomo, diversos factores determinan su grado de biodisponibilidad: el modo y especie química en que se emite, el medio en el que se encuentra, su perdurabilidad en ese medio, etcétera.

Respecto a la hidrosfera, pocos compuestos de plomo se disuelven en agua y los que sí son solubles acaban reaccionando muy rápidamente para dar otros compuestos más insolubles que precipitan, incorporándose así a los sedimentos del lecho de los ríos o al fondo marino, donde subsisten durante miles de años. Así pues, es muy raro que se den altas concentraciones de plomo en agua y siempre se deben a contribuciones muy localizadas, como residuos acuosos de una minería o aumentos puntuales del pH que favorecen la redisolución de dichos precipitados.

Cuando se emite a la atmósfera, el tiempo de residencia del plomo varía desde los pocos segundos hasta las 3-4 semanas, dependiendo del tamaño de las partículas. Las emisiones de refinerías e incineradoras, al estar en forma de cualquiera de los óxidos de plomo o como plomo metálico, no sufren reacciones importantes. Sin embargo, el plomo resultante de la combustión de la gasolina se dispersa en forma de haluros, oxohaluros e hidroxohaluros, que pierden la mayoría de los átomos de cloro y bromo en menos de un día [11].

En comparación con la atmósfera y la hidrosfera, el suelo es un medio más complejo, heterogéneo, que comprende sólidos orgánicos y minerales, componentes acuosos y componentes gaseosos íntimamente relacionados. Los procesos químicos que afectan a la biodisponibilidad de los metales son aquellos que implican la adsorción desde la fase líquida a la fase sólida (ya que, en principio, son éstos últimos los más difícilmente accesibles a la biota) y están fuertemente influenciados por el pH, las condiciones redox y las concentraciones relativas de otros iones presentes en la solución acuosa del suelo.

El plomo suele entrar en contacto con el suelo en forma de sus tres minerales principales -galena (PbS), cerusita (PbCO_3) y anglesita (PbSO_4)-, productos de la minería, o bien en las formas antes citadas para las emisiones atmosféricas. En un primer momento, las formas solubles de plomo pasan rápidamente a especies más insolubles y después quedan inmovilizadas debido mayoritariamente al intercambio iónico y por complejación con la materia orgánica. El intercambio iónico se debe a la sustitución isomórfica del Pb^{2+} (radio iónico 124 pm.) por K^+ (133 pm.) en feldespatos y

por Ca^{2+} (106 pm) en carbonatos y apatita, mientras que la materia orgánica -sobre todo si es rica en ácidos húmicos de alto peso molecular- forma complejos con el plomo gracias a los grupos hidroxilo, carboxilo y fenoles que contiene [12].

Estos procesos y la baja degradación microbiana que sufre el plomo hacen que probablemente sea el menos móvil de los metales pesados, que presente una mínima penetración vertical, y que su vida media en suelos se sitúe entre los 800 y los 6000 años [13].

1.4. Toxicidad

El plomo es un elemento químico sin función biológica aparente y con la propiedad de acumularse en el organismo. Su toxicidad era conocida ya desde la Antigüedad pero la comprensión del alcance total de sus efectos nocivos y la baja dosis necesaria para producirlos es relativamente reciente.

Las vías de exposición mayoritarias son la inhalación y la ingestión. Casi todo el plomo inhalado por el cuerpo es absorbido, así como el 20-70% del ingerido (siendo mayor este porcentaje en dietas pobres en hierro, calcio y zinc [14]). Otra vía de exposición es la dérmica, aunque sólo se considera peligrosa en trabajadores de la industria del plomo o por contacto con gasolina plomada.

Una vez absorbido, el plomo entra en el torrente sanguíneo donde se enlaza a los glóbulos rojos y otras proteínas de membrana eritrocitaria por un periodo medio de 35 días [15], depositándose finalmente en los huesos (donde sustituye al calcio) y, de forma minoritaria, en los tejidos blandos. Estos depósitos plúmbicos almacenados en el esqueleto no conllevan ninguna consecuencia nociva, pero suponen una fuente potencial para otros tejidos en tanto que el plomo puede ser movilizado bajo circunstancias especiales como stress, embarazo, menopausia, osteoporosis, etcétera [16]. De hecho, la medida del plomo en hueso (*in vivo*, por fluorescencia de rayos X *K-shell*) está sustituyendo al nivel de plomo en sangre como biomarcador más utilizado en los estudios epidemiológicos, ya que resulta más fidedigno para enfermedades derivadas de la cronicidad en la exposición [17].

En la actualidad se considera que el plomo origina dos clases de efectos tóxicos bien diferenciados, los que afectan al sistema nervioso central y los que afectan al resto de elementos fisiológicos (siendo los sistemas más críticos el hematológico, renal y nervioso periférico). Cada uno de estos efectos, a su vez, se distingue como agudos cuando son causados por una dosis reciente, o bien como crónicos cuando se deben a dosis acumulativas. Como se puede observar en la Tabla 1, el plomo origina un amplio espectro de consecuencias adversas que van de lo sutil -cambios subclínicos- hasta intoxicaciones amenazantes para la vida.

Esta sintomatología tan variada (dejando para el siguiente punto los efectos neurotóxicos) se debe a que el plomo interacciona con algunas de las proteínas que se enlazan de forma natural con calcio o zinc [18-20], impidiendo o modificando así el correcto funcionamiento de éstas y, por tanto, derivando en alguna anomalía o dolencia.

Dos ejemplos de proteínas por las cuales plomo y calcio compiten serían las sinaptotagminas [21], que es un neurotransmisor asociado a la sinapsis neuromuscular, y la proteína quinasa C (PKC) [22, 23], ubicada en el cuerpo humano y cuyo mal funcionamiento podría afectar prácticamente cualquier órgano. Respecto a las proteínas que naturalmente se enlazan con el zinc, podríamos citar la protamina humana 2 (PH2) [24] que juega un importante papel en la espermatogénesis, o la más estudiada hasta la fecha, el enzima ácido δ -aminolevulínico-deshidratasa (AALD) que se encuentra en el ciclo de la biosíntesis del grupo prostético hemo, y cuyo mal funcionamiento explicaría la anemia observada para niveles de plomo en sangre mayores de 40 $\mu\text{g}/\text{dL}$ [20].

La mayoría de enzimas del zinc contienen un centro activo mezcla de histidina, cisteína y residuos carboxílicos, mientras que el enzima AALD contiene un único centro activo con tres residuos de cisteína [25]. La afinidad relativa del plomo con respecto al zinc para el AALD es la más alta que se conoce [26], dando así una idea de la afinidad del plomo por este aminoácido presente también en las fitoquelatinas.

1.4.1. Neurotoxicidad e impacto sobre la capacidad de aprendizaje

La toxicidad del plomo afecta a adultos y a niños, pero es más preocupante en estos últimos ya que experimentan los mismos síntomas a niveles de plomo en sangre significativamente menores [27]. Además, los niños pueden desarrollar problemas

Tabla 1: Riesgos para la salud en adultos y procedimientos recomendados según intervalos de concentración de plomo en sangre.

Nivel de plomo en sangre ($\mu\text{g/dL}$)	Riesgos a corto plazo (exposición < 1 año)	Riesgos a largo plazo (exposición \geq 1 año)	Gestión recomendable
< 5	No documentado	No documentado	No indicados
5 - 9	Possible aborto espontáneo Possible retraso en desarrollo neonatal	Possible aborto espontáneo Possible retraso en desarrollo neonatal Possible hipertensión y disfunción renal	Examinar riesgos para la salud Reducir la exposición en embarazadas
10 - 19	Ídem más: Peso al nacer reducido	Ídem más: Peso al nacer reducido Hipertensión y disfunción renal Possible déficit neurocognitivo subclínico	Ídem más: Disminución de la exposición Aumentar el monitoreo biológico Considerar alejamiento de la exposición si NPS es \geq 10 $\mu\text{g/dL}$
20 -29	Ídem	Ídem más: Aumento de la porfirina plasmática	Alejamiento de la exposición si las medidas de NPS durante 4 semanas son \geq 20 $\mu\text{g/dL}$
30 -39	Ídem más: Aborto espontáneo	Ídem más: Aborto espontáneo Déficit neurocognitivo Posibles síntomas no específicos	Alejamiento de la exposición
40 -79	Ídem más: Síntomas no específicos Déficits neurocognitivos Anomalías espérmicas	Ídem más: Síntomas no específicos Disfunción renal / nefropatía Neuropatía periférica subclínica Anomalías espérmicas Anemia Cólico Possible gota	Alejamiento de la exposición Evaluación médica urgente Considerar terapia de quelación si existen síntomas evidentes de toxicidad por plomo
\geq 80	Ídem más: Encefalopatía Anemia Cólico	Ídem más: Nefropatía Neuropatía periférica Gota	Alejamiento de la exposición Evaluación médica inmediata Probable terapia de quelación

NPS, nivel de plomo en sangre

Síntomas no específicos: dolor de cabeza, fatiga, alteraciones del sueño, anorexia, estreñimiento, artralgia, mialgia, disminución de la libido, irritabilidad, cambios de humor.

Fuente: M. J. Kosnett *et al.* "Lead Exposure and Health Effects in Adults: Evidence, Management, and Implications for Policy", *Environ. Health Perspect.*, 115 (2007) 46.

neurológicos y de desarrollo permanentes cuando la exposición al plomo es crónica -exposición que puede empezar desde el estado fetal-, mientras que este tipo de síntomas experimentados en adultos son reversibles cuando la exposición cesa.

Estos problemas neurológicos asociados a la infancia suelen ser de índole conductual y cognitiva. Ha quedado demostrado un déficit entre 0 y 5 puntos en el cociente intelectual por cada incremento del nivel de plomo en sangre de 10 $\mu\text{g/dL}$, valor a partir del cual también pueden darse otras alteraciones como el síndrome de déficit de atención, irritabilidad excesiva, o bien mermas en la coordinación visual-motora, la percepción espacial-organizativa, la habilidad lectora, etcétera [28-31] y, de forma más general, dificultades en el proceso de aprendizaje. Sin embargo, datos recientes sugieren que el umbral desencadenante de estos déficits cognitivos infantiles podría ser aún más bajo de 10 $\mu\text{g/dL}$ [32].

A pesar de la amplia documentación existente acerca de los efectos tóxicos del plomo sobre el sistema nervioso central infantil, no se ha conseguido aún una elucidación completa y detallada del modo por el cual el plomo ejercería tales efectos. La apreciación subyacente es que el plomo afectaría al aprendizaje y a la memoria interfiriendo en los mecanismos de sinapsis neuronal que consolidan el desarrollo cognitivo. La plasticidad neuronal desarrollada desde las primeras experiencias postnatales y su fenómeno asociado de la potenciación a largo plazo (LTP) en el hipocampo son procesos muy complejos controlados por diferentes estructuras proteicas que, a su vez, están reguladas por el flujo de calcio. Para algunas de estas estructuras, como por ejemplo la calmodulina [33], la proteína quinasa C (PKC) [22] o el receptor del ácido N-metil-D-aspartico (NMDAR) [34], se sabe desde hace años que el plomo es un selectivo y potente inhibidor, por lo que su disfunción explicaría los susodichos déficits cognitivos. Actualmente existen diversas hipótesis -no necesariamente excluyentes- acerca de qué estructuras y en qué grado están involucradas en la neurotoxicidad del plomo, siendo el receptor de NMDA el que más evidencias acumula y el único para el que se sabe de forma bastante exacta cómo es afectado por el plomo [35-36].

2

Fitorremediación del plomo

2.1. Aspectos generales de la fitorremediación

Debido a su naturaleza inmóvil, las plantas han desarrollado mediante mutaciones genéticas y adaptaciones fisiológicas modos de supervivencia en ambientes excepcionales, incluidos aquellos que de forma natural presentan altas concentraciones de sustancias venenosas. En lo que a metales pesados se refiere, desde mediados del siglo XIX se conocen especies de plantas endémicas de suelos muy ricos en metales que presentan niveles anormales de acumulación de los mismos en sus tejidos.

Los científicos advirtieron cierta analogía con el uso de microorganismos en la biorremediación, a saber, aprovechar racionalmente los procesos naturales de las plantas para descontaminar ecosistemas como método de bajo impacto medioambiental, pero con la diferencia esencial de poder retirar los metales mediante la siega de forma permanente.

Con el tiempo, y como resultado de los diferentes experimentos de laboratorio y de campo, ha ido estableciéndose un corpus científico-tecnológico llamado fitorremediación, que engloba las siguientes técnicas:

- *Fitoextracción*: la planta extrae los contaminantes del medio a través de su sistema radicular y los traslada a brotes y hojas donde se acumulan: entonces, se cosecha la parte superior de las plantas. Se utiliza con metales pesados y radionúclidos en suelos, sedimentos y lodos.

- *Fitoestabilización*: la planta inmoviliza los tóxicos en la rizosfera mediante sorción, precipitación o complejación. Se aplica a los mismos contaminantes y medios que la fitoextracción.
- *Fitodegradación*: la planta extrae los contaminantes del medio y en su interior sufren procesos enzimáticos para producir metabolitos convencionales o, bajo procesos de oxidación profunda, CO₂ y H₂O. A veces la degradación se da en la rizosfera debido a exudados de la raíz o a asociaciones simbióticas con microorganismos. Se utiliza con compuestos orgánicos en cualquier biotipo.
- *Fitovolatilización*: la planta extrae los contaminantes y los expulsa a la atmósfera por transpiración sin que estos sufran cambios químicos. Se aplica a compuestos orgánicos volátiles, selenio, mercurio y arsénico en suelos, sedimentos, lodos y aguas freáticas.
- *Rizofiltración*: la planta absorbe y concentra los tóxicos en la raíz sin que preferentemente se transfieran a otras partes de la planta. La cosecha se realiza tan sólo de las raíces. Se utiliza con metales y radionúclidos en aguas contaminadas.

Los proyectos de fitorremediación generalmente comienzan con estudios a pequeña escala en invernaderos, donde con muestras de suelo o agua contaminados se determinan diferentes parámetros como la biodisponibilidad y estratificación del tóxico, la elección de la especie a utilizar, etc. Con los datos adquiridos y llegada la fase de ejecución, el personal responsable se dedica a las diferentes etapas de siembra, inspección durante el cultivo, aplicación de compuestos modificantes del suelo, supervisión durante la recolección y disposición de la biomasa. Por último, una vez confirmado que los niveles de contaminación del medio están por debajo de los estándares requeridos, se procede a cerrar el proyecto; de lo contrario, un segundo ciclo de siembra se lleva a cabo.

La biomasa recolectada se gestiona como otros residuos tóxicos, es decir, o bien se le aplican tratamientos de reducción de peso y volumen para su disposición final en vertederos, o bien se reciclan los compuestos contaminantes si resulta rentable, como en el caso de ciertos metales pesados.

Las ventajas de la fitorremediación sobre las técnicas tradicionales de descontaminación pasan por ser aquella una técnica *in situ*, estéticamente agradable, que no daña la estructura del suelo ni cambia apenas la población microbiana (incluso cuando un grupo taxonómico nuevo es introducido) y que no necesita grandes aportes de equipamiento mecánico ni de energía. Es precisamente la competitividad económica de las tecnologías de fitorremediación -más que su probada aceptación pública- la que está impulsando su creciente asentamiento como técnica preferencial de descontaminación. Concretamente, y según datos oficiales [37], el proceso de fitoextracción para un acre de suelo contaminado con plomo supone un ahorro del 50 - 65 % respecto a los métodos convencionales de excavación y limpieza *ex situ*.

Los inconvenientes principales de la fitorremediación son la duración total de los proyectos (crecimiento lento de muchas plantas, dependencia estacional) y su inaplicabilidad cuando la contaminación es realmente elevada. Muchos de estos u otros inconvenientes están siendo minimizados gracias al desarrollo de la ingeniería genética y a la mejor elucidación de la funcionalidad de un creciente número de genes responsables de la tolerancia a los tóxicos.

2.2. Eficiencia de la fitorremediación del plomo

Una compleja red de procesos determina la homeostasis de los metales en las plantas, funciones coordinadas de absorción, transporte y almacenamiento en diferentes tejidos. Estas funciones están gobernadas más por requerimientos fisiológicos que de toxicidad, pues las plantas han desarrollado una gran tolerancia a algunos metales no esenciales (y al exceso de metales esenciales) aparentemente por su capacidad de descontaminación a nivel celular.

Entre los mecanismos de tolerancia/descontaminación de metales descritos en la literatura -volatilización, adhesión a la pared celular, transporte directo a las vacuolas vía intercambiadores, absorción reducida, etcétera- destaca el enlace con ligandos sintetizados en la propia planta que conlleva la anulación de sus efectos tóxicos. Estos ligandos pueden ser ácidos orgánicos (cítrico, málico, oxálico...), aminoácidos (histidina) y péptidos (glutación, fitoquelatinas).

A continuación se describen las etapas que conforman el proceso global de descontaminación de metales en las plantas (sin profundizar excesivamente en ellas, pues quedan fuera del ámbito de la presente tesis), incidiendo en aquellos factores que determinan especialmente la eficiencia de la fitoextracción/rizofiltración del plomo. En el apartado 2.3 se detallarán la síntesis y modo de actuación de las fitoquelatinas, el principal ligando detoxificante de metales pesados no esenciales.

2.2.1. Movilización

La biodisponibilidad de la mayoría de los metales es limitada dada su baja solubilidad en agua aireada o su fuerte unión a las partículas de suelo. Con la notable excepción del hierro, poco se conoce actualmente sobre la movilización activa de los metales por parte del sistema radicular. La acidificación provocada por la rizosfera [38] y los exudados de ciertos carboxilatos [39, 40] parecen ser los mecanismos más plausibles para lograr una mayor acumulación de metal disponible en las inmediaciones de la raíz (fig. 1a).

Sin embargo, lograr una movilización de metales pesados adecuada como para considerar que el sucesivo proceso de fitoextracción será eficiente, necesita muchas veces de procedimientos externos que alteren las condiciones del suelo. Esto es especialmente crítico en el caso del Pb(II) -su biodisponibilidad es extremadamente baja-, e incluso los métodos habituales que solubilizan otros metales pesados en la fase líquida del suelo resultan poco útiles.

Los mejores resultados para el Pb(II) se han conseguido con la adición de agentes quelantes al suelo, un procedimiento algo drástico que permite la formación de complejos y la subsiguiente disminución de iones metálicos libres en solución, permitiendo así la redisolución de las fases precipitadas o absorbidas hasta que un nuevo equilibrio tiene lugar entre el metal complejado, el metal libre y las fases insolubles.

Los primeros agentes complejantes que se probaron fueron diversos ácidos aminopolicarboxílicos sintéticos, siendo el EDTA y el HEDTA los que mayores incrementos de movilización del plomo consiguieron [41-45]. Este tipo de ligandos parece movilizar una cantidad de metales superior a la que absorbe después la planta, lo que sumado a su baja biodegradabilidad y a su naturaleza complejante no selectiva,

conlleve un riesgo de incrementar la filtración de contaminantes en aguas freáticas y subterráneas, incluso una vez se ha completado el proyecto de fitoextracción [46, 47]. Por este motivo, se ha investigado la utilización de ácidos aminopolicarboxílicos sintéticos con un grado superior de lipofilia y, por tanto, con un menor riesgo de filtración como el HBED [48]; ácidos aminopolicarboxílicos naturales y fácilmente biodegradables como el EDDS [49] o el NTA [50]; o bien ácidos orgánicos naturales de bajo peso molecular [51, 52]. Aunque los resultados son buenos para el HBED y el EDDS, quedan lejos de la capacidad movilizadora del Pb(II) por parte del EDTA.

Otra aproximación alternativa es la remediación electrolítica [53], esto es, el uso de campos eléctricos aplicados en el suelo para movilizar los contaminantes. Dado que la adición de agentes complejantes sigue siendo necesaria para el transporte del Pb(II) a las partes superiores de la planta -como más tarde se verá-, esta técnica permite disminuir la cantidad necesaria de ligandos y, en consecuencia, también sus posibles efectos medioambientales adversos.

2.2.2. Absorción

Tras la movilización por parte de la rizosfera, los metales pesados son absorbidos junto con el agua y otros nutrientes esenciales por la epidermis de la raíz, cuya pared celular funciona como un intercambiador de iones de baja afinidad y selectividad (fig. 1b). En su camino hacia los vasos del xilema (que es el sistema de transporte de la savia hacia la parte distal de la planta), los metales pueden cruzar la raíz siguiendo la ruta apoplástica -vía difusión a través de las paredes celulares- o bien siguiendo la ruta simplástica -vía transporte activo a través del citosol de las células-.

Siguiendo con la figura 1b, observamos como ambos espacios, apoplasto y simplasto, están separados por una membrana plasmática que regula el paso de nutrientes al interior de la célula gracias a los diversos transportadores de cationes que contiene, y cuya fuerza proviene del elevado gradiente de potencial que generan las proteínas de membrana H^+ -ATPasa. A pesar de que se desconocen muchos aspectos de su funcionalidad, parece probable que la mayoría de estos transportadores catiónicos actúen bajo un amplio rango de sustratos, permitiendo incluso que metales tóxicos entren en las células [54]. Una vez dentro del citosol, los efectos fitotóxicos de los metales pesados se maximizan al afectar al núcleo y a los diferentes orgánulos celulares.

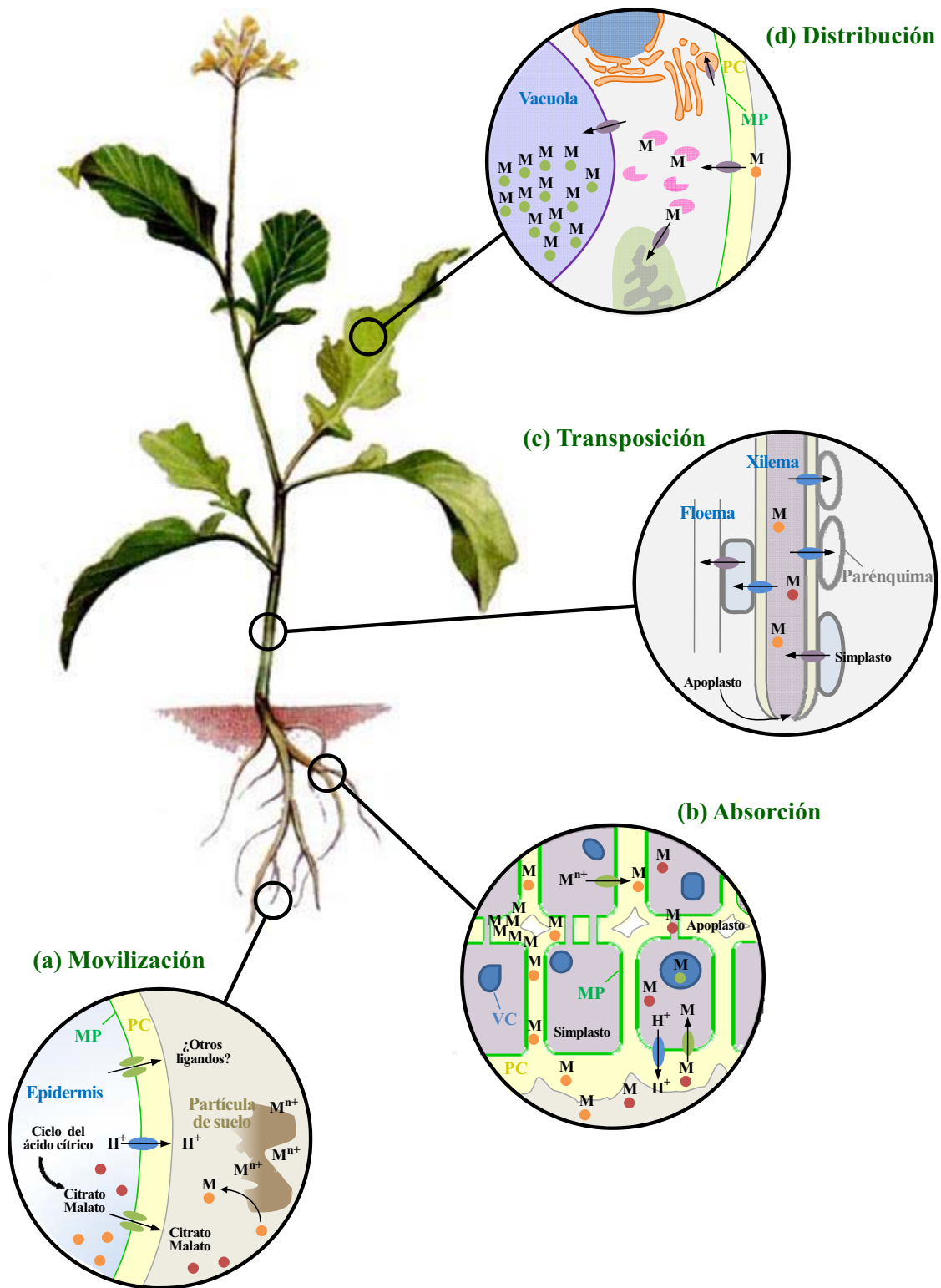


Figura 1. Etapas y mecanismos moleculares implicados en la acumulación de metales en plantas.

PC: pared celular; MP: membrana plasmática; VC: vacuola; M: metal; círculos: ligandos; óvalos: transportadores, óvalos dentados: proteínas metalochaperonas.

Para evitar esta libre circulación, las células de la raíz presentan dos mecanismos de defensa: bombear los metales para devolverlos al apoplasto (exocitosis) o bien la síntesis citosólica de fitoquelatinas para transportarlos complejados a las vacuolas donde acaban acumulándose (endocitosis).

Respecto al proceso de fitorremediación del plomo, resulta importante incidir en el papel de las sustancias quelantes que consiguen la movilización previa del metal. La teoría predominante apoyaba el hecho que sólo los iones libres de Pb(II) podían ser absorbidos por la raíz, quedando el ligando en la fase líquida del suelo. Sin embargo, otros estudios demuestran con marcadores isotópicos ^{14}C en la molécula de EDTA que el complejo metal-ligando es absorbido por la planta, transportándose así hasta brotes y hojas [55, 56]. También pudiera ser que, una vez movilizado el plomo del medio, ligando y metal entrasen libres por la epidermis de la raíz para formar de nuevo el complejo en el interior de la planta [51].

En cuanto al comportamiento de los complejos Pb-EDTA dentro de la raíz, se ha demostrado que, una vez absorbido, el complejo puede seguir tanto el camino apoplástico como el simplástico [56], y que cuando el mecanismo de endocitosis no es suficiente para la descontaminación del plomo, en algunas especies de plantas se produce la exclusión definitiva en el apoplasto en forma de plomo precipitado en la pared celular [57, 58].

2.2.3. Transposición

La movilización y la absorción de metales pesados constituyen las etapas esenciales de la rizofiltración. La fitoextracción necesita, además, la transposición de estos tóxicos desde la raíz a los brotes y hojas o, más exactamente, a cualquier parte de la planta que sea fácil de cosechar. Esta necesidad es evidentemente de índole económica, pues el suelo queda limpio de metales -en tanto que absorbidos y acumulados en la raíz-, pero el proyecto de fitorremediación sería económicamente menos competitivo.

Diversos procesos fisiológicos rigen el transporte a gran distancia en las plantas. El modelo general de la transposición de metales (fig. 1c) incluye primero el paso desde el simplasto de la raíz hasta los vasos del xilema, si bien también puede ocurrir desde el apoplasto de forma minoritaria; luego el transporte en sí a través del xilema, que está

controlado activamente por la transpiración, la funcionalidad de los diferentes transportadores [54], la acumulación de metales en las células de la parénquima, y otros procesos metabólicos; por último, la reabsorción de los metales por las células foliáceas del mesófilo mediante proteínas de membrana transportadoras. El transporte puede darse a la inversa cuando es necesario, es decir, de las hojas a la raíz a través de los vasos del floema.

Para conseguir una fitorremediación eficaz, la ratio de concentración de metales entre las hojas y la raíz tiene que ser superior a la unidad. Diversos estudios han demostrado que el paso de simplasto al xilema depende de si previamente los metales son complejados en las células de la raíz por diferentes ligandos naturales para ser transportados de este modo. Así, por ejemplo, se ha probado la relación lineal entre la concentración de histidina libre en la raíz y el transporte de níquel en el xilema [59], y resultados semejantes se han publicado también para otros metales (cobre, cadmio, zinc o el propio níquel) con varios ligandos (nicotianamina, citrato, histidina, fitoquelatinas) [60-63], dependiendo de la especie estudiada.

Sin embargo, desde los primeros estudios de fitorremediación del plomo, se hizo evidente que este metal tiene poca tendencia a transponerse, pues más del 70% del plomo total absorbido por la planta queda en la raíz [43, 64]. Huang *et al.* corroboraron, además, que las hojas tenían la misma capacidad de acumular plomo que la raíz [65], confirmando que el transporte a gran distancia es la etapa limitante de la fitoextracción del plomo.

Probablemente, la causa de esta restricción sea la elevada tendencia del plomo a precipitar en las paredes celulares del apoplasto radicular, sin que los ácidos orgánicos u otras moléculas quelantes naturales puedan llegar a redissolverlos enteramente. Por contra, las sustancias que se añaden para aumentar la solubilización del plomo en el suelo impiden también su precipitación en el apoplasto, permitiendo así su introducción en el xilema donde son transportados aún como complejos [55, 66]. De hecho, *grosso modo*, los ligandos citados en el punto 2.1.1. ofrecen una relación directa entre su capacidad movilizadora y su capacidad de transposición, por lo que las mayores eficiencias de fitoextracción -hasta centuplicarlas en algunos casos- se consiguen con el EDTA y el HEDTA.

2.2.4. Distribución y almacenamiento

Cuando los metales alcanzan las hojas se distribuyen y almacenan de forma parecida a como lo hacen en la raíz. Así, se dispersan siguiendo el apoplasto para entrar finalmente en las células mediante transportadores secundarios de membrana, poco específicos. El mantenimiento de la concentración fisiológica de metales esenciales requerida por cada orgánulo celular se consigue por medio de proteínas transportadoras (llamadas proteínas metalochaperonas) y bombas ATPasas tipo P (fig. 1d).

El exceso de metales esenciales -que también puede llegar a ser tóxico- se transfiere otra vez al apoplasto para su redistribución y almacenamiento, preferentemente en estructuras epidérmicas como las tricomas. Respecto a los metales no esenciales como el Pb(II) y dado que las entradas a los orgánulos celulares también son poco específicas [67], las células de las hojas presentan mecanismos de defensa que impiden su interacción con los grupos prostéticos de proteínas o enzimas. Estos mecanismos son, como en la raíz, la exclusión en el apoplasto y la compartimentación en vacuolas, si bien es cierto que siendo ahora la cantidad de biomasa disponible mucho mayor, el mecanismo de exocitosis tiene una importancia menor que el de endocitosis.

2.3. Fitoquelatinas

Desde principios de la década de los 80 se conocía que levaduras y plantas inducían la síntesis de moléculas ricas en grupos sulfhidrilo al ser cultivadas en medios con una elevada concentración de cadmio, pero no es hasta 1985 que Grill *et al.* determinan su estructura y las denominan fitoquelatinas [68]. En investigaciones posteriores se asienta la idea de que las fitoquelatinas son polipéptidos sintetizados en el citosol para desactivar el efecto fitotóxico de los metales no esenciales. Esta desactivación se produce mediante la formación vía tiolatos de complejos metal-fitoquelatina de extraordinaria estabilidad, y su posterior secuestro en orgánulos de bajo metabolismo (principalmente vacuolas) donde quedan aislados.

2.3.1. Estructura

Las fitoquelatinas (PC) están compuestas básicamente por tres aminoácidos: ácido glutámico (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly). La secuencia de aminoácidos que define

su estructura primaria corresponde a un ácido glutámico -que ocupa la posición amino terminal- unido a una cisteína a través de un enlace γ -carboxilamida; esta unidad γ -Glu-Cys se repite n veces hasta finalizar con un residuo de glicina, que ocupa así el extremo carboxilo terminal (fig. 2). La fórmula general de estos péptidos se expresa, pues, como $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde n puede llegar a 11 pero suele variar entre 2 y 5, y donde el aminoácido C-terminal puede cambiar dando lugar a cinco variaciones estructurales de fitoquelatinas [69]. La manera simplificada de nombrar estos ligandos es PC_2 , PC_3 , PC_4 , según n sea 2, 3, 4 y así sucesivamente.

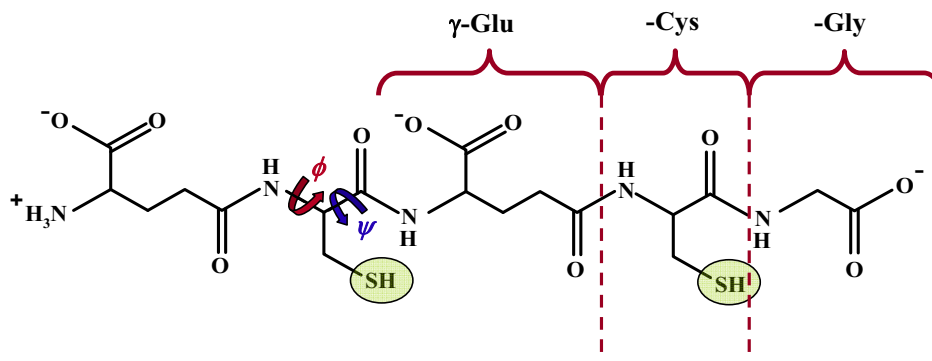


Figura 2. Estructura de una fitoquelatina $n = 2$. Se indican los ángulos que conforman un plano peptídico y los grupos sulfhidrilo.

Estructuralmente, las fitoquelatinas están relacionadas con el glutatión (GSH), un tripéptido natural de fórmula $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$. De hecho, el GSH es el sustrato para la biosíntesis de fitoquelatinas como parecían indicar algunos trabajos pioneros: *i*) la síntesis única de homoPC ($(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-}\beta\text{-Ala}$) en especies de plantas que sólo contienen homoGSH ($\gamma\text{-Glu-Cys-}\beta\text{-Ala}$) [70]; *ii*) la inhibición química de la biosíntesis de GSH impide la producción de fitoquelatinas [71]; *iii*) las plantas genéticamente modificadas deficientes en la biosíntesis de GSH son también deficientes en fitoquelatinas [72]. Finalmente, Oven *et al.* demostraron que el tipo de sustrato (GSH y sus isoformas) y no la especificidad del enzima determina la naturaleza de las PC sintetizadas [73].

La presencia de grupos sulfhidrilo confiere al GSH y a las PC la propiedad de enlazar fuertemente diferentes iones metálicos. Aunque ésta parece ser su principal función, no es la única; los grupos tiol son nucleófilos y reductores por lo que también

reaccionan dentro de las células con otras especies tóxicas como radicales libres, especies oxidantes y xenobióticos orgánicos electrófilos [74,75].

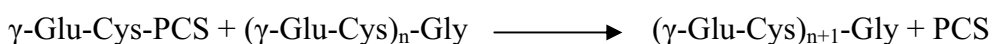
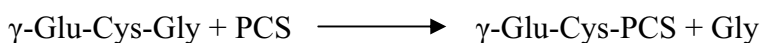
2.3.2. Biosíntesis

La unión entre los residuos de ácido glutámico y cisteína a través de un enlace γ -carboxilamida denota que las fitoquelatinas no están codificadas directamente por genes, sino que son el producto de una ruta biosintética. Concretamente, el enzima que cataliza la reacción es el γ -glutamylcisteína dipeptidil transpeptidasa [76,77], aunque recibe el nombre trivial, menos específico, de fitoquelatín sintasa (PCS).

La síntesis de PC está inducida por la entrada en la célula de iones metálicos. Se ha constatado este hecho para una enorme variedad de ellos, incluidos Ag^+ , As^{3+} , As^{5+} , Au^+ , Bi^{3+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Ga^{3+} , Hg^{2+} , In^{3+} , La^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Pd^{2+} , Sb^{3+} , Se^{4+} , Sn^{2+} , Te^{4+} , W^{6+} , Zn^{2+} [76, 78, 79], en general metales considerados blandos que presentan una mayor afinidad por los grupos sulfhidrilo. Entre todos los iones metálicos estudiados, el plomo es uno de los principales inductores de la síntesis de fitoquelatinas [76, 78], aunque es el cadmio el metal que mejor activa este proceso, sirviendo de base para la mayoría de los primeros estudios de la síntesis y funciones de las PC.

El mismo grupo de investigación que determinó la estructura de las PC propuso que el mecanismo de activación de su biosíntesis es el enlace directo de los cationes metálicos con el enzima PCS. Así, una vez activado el enzima, la reacción de la biosíntesis de fitoquelatinas constaría de dos pasos [80]:

Mecanismo I

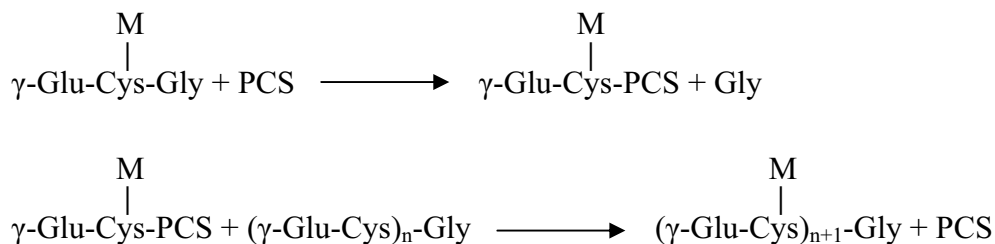


Según este mecanismo I, en una primera etapa la escisión de un resto de glicina de una molécula de GSH es concomitante a la unión del dipéptido γ -Glu-Cys al enzima PCS; la transpeptidación se completa con la transferencia de dicha unidad γ -Glu-Cys a una molécula aceptadora, por ejemplo GSH para formar PC_2 y, más generalmente, PC_n para formar PC_{n+1} .

Sin embargo, este modelo suscita la cuestión de cómo un enzima puede ser activado por un conjunto de metales tan grande, sobre todo teniendo en cuenta que esto ocurre con una efectividad independiente de la afinidad específica que presenta cada metal por el enzima PCS [81].

Un mecanismo sustancialmente diferente ha sido propuesto por Vatamaniuk *et al.* [82] en el cual el enlace metal-PCS no es el responsable primario de la acción catalítica, sino un complejo metal-glutatión. En este caso, el complejo M-GSH (o un complejo M-PC) y una molécula de PC libre actuarían respectivamente como donador y aceptor del dipéptido γ -Glu-Cys, permitiendo dar respuesta a las dudas planteadas. El mecanismo resultante sería en este caso:

Mecanismo II



Aparte del modo de activación del enzima PCS, existen dos diferencias más entre los mecanismos propuestos (indicados como I y II en la figura 3). Por un lado, los productos en I son fitoquelatinas libres (apo PC), mientras que en II el producto sería directamente el complejo metal-PC. Por otro lado y como consecuencia, I resultaría un mecanismo autorregulado en el cual la biosíntesis de PC concluiría cuando los productos de la reacción complejan los iones metálicos activadores del proceso; sin embargo, según el mecanismo II donde el metal forma parte del sustrato, el término de la síntesis de fitoquelatinas resultaría simplemente del agotamiento del propio sustrato.

Actualmente, ninguno de los dos mecanismos propuestos se considera enteramente establecido en la comunidad científica. Tal vez la intermediación de Tsuji *et al.* sea el enfoque más correcto [83], pues sugiere que serían los complejos $\text{M}(\text{GSH})_n$ los inductores del plegamiento del enzima PCS a una conformación tridimensional activa, pero la transpeptidación del fragmento γ -Glu-Cys entre moléculas donantes yceptoras se produciría según propone el mecanismo I.

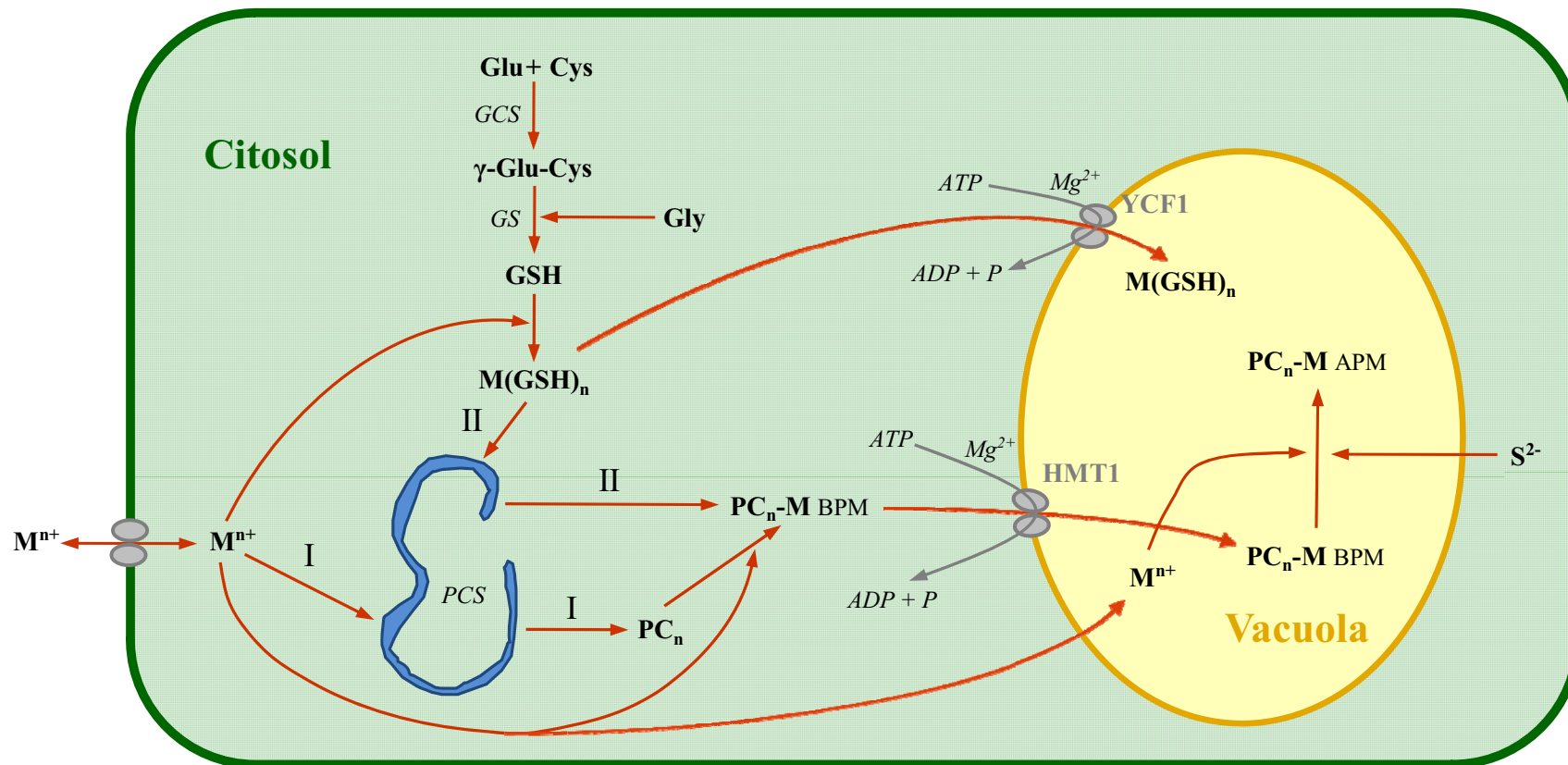


Figura 3. Representación esquemática de la descontaminación de metales por fitoquelatinas: biosíntesis de fitoquelatinas (con los dos mecanismos propuestos indicados como I y II) y compartimentación en las vacuolas.

GCS: γ -Glutamilcisteín sintetasa; *GS*: Glutatión sintetasa; *PCS*: Fitoquelatín sintasa ; **PC_n-M BPM**: complejo fitoquelatina-metal de bajo peso molecular; **PC_n-M APM**: complejo fitoquelatina-metal de alto peso molecular; **YCF1**: Proteína vacuolar codificada por el gen Yeast Cadmium Factor; **HMT1**: Proteína vacuolar codificada por el gen Heavy Metal Tolerance.

Obviamente, la síntesis de PC es idéntica independientemente del metal que la induce. En lo que respecta al Pb(II), queda probada específicamente por la hipersensibilidad a este metal que adquieren las plantas cuando presentan una deficiencia tanto en los enzimas que sintetizan GSH como en el propio enzima PCS [84, 85].

2.3.3. Mecanismo de actuación

Sea cual fuere el mecanismo de biosíntesis de las fitoquelatinas, los complejos formados con los metales tóxicos se trasladan hasta las vacuolas donde quedan secuestrados. Los transportadores de membrana vacuolar que permiten la entrada de estos complejos han sido identificados en levaduras. Concretamente, el HMT1 es el transportador ATP-dependiente que rige la entrada tanto de la PC libre como complejada [86]. Más recientemente se ha descubierto el YCF1, otra bomba transportadora ATP-dependiente que introduce en la vacuola glutatión conjugado con compuestos orgánicos, pero también complejos metálicos como $\text{Cd}(\text{GSH})_2$, $\text{As}(\text{GSH})_3$ o $\text{Hg}(\text{GSH})_2$ [87-89]. Respecto a las plantas, sus proteínas transportadoras no han sido identificados aún, pero se presume que éstas deben ser homólogas pues al sobreexpresar sus genes codificantes de levaduras a plantas, se consiguen también una mayor tolerancia y acumulación de iones metálicos, incluido el Pb(II) [90, 91].

En algunas especies de plantas y hongos que acumulan cadmio se ha demostrado la existencia de dos tipos de complejos, referidos como complejos de bajo y alto peso molecular. La diferencia entre ellos es la incorporación -ya dentro de la vacuola- de iones sulfuro en la estructura de los complejos de bajo peso molecular de forma que aumenta la cantidad de cationes metálicos detoxificados por molécula de PC y su estabilidad global. En los casos de mayor ratio $\text{S}^{2-}:\text{Cd}^{2+}$, los complejos de alto peso molecular consisten en agregados de unos 20 Å de diámetro con un cuerpo central monocristalino de CdS protegido por una capa externa de PC [92], siendo más estables cuanto más largas son la moléculas de fitoquelatinas. La procedencia de los iones sulfuro no ha sido clarificada aún, aunque se sabe que está relacionada con el mecanismo de biosíntesis de la adenina [93].

La formación de complejos de alto peso molecular es la única etapa del mecanismo de acción de las fitoquelatinas que no ha sido confirmada para el plomo ni, de hecho,

para ningún otro metal excepto el cadmio. Dado que se descubrieron hace veinte años y que desde entonces el número de artículos científicos dedicado al estudio de diferentes aspectos de las PC ha crecido ininterrumpidamente, es posible que esta forma ulterior de almacenaje de metales en las vacuolas sólo se dé con el cadmio y en ciertas especies de plantas.

Referencias I

1. <http://www.atsdr.cdc.gov/cercla/07list.html>, consultado el 30 de Noviembre de 2010.
2. P. H. Pritchard, Ch. F. Costa, *Environ. Sci. Technol.*, 25 (1991) 372.
3. J.O. Nriagu. *Lead and Lead poisoning in Antiquity*, John Wiley & Sons, 1st ed., New York (1983).
4. *Minerals Yearbook, Vol. I, Metals & Minerals*. U.S. Geological Survey, Department of the Interior (2007).
5. I. Thornton, *Metals in the global environment: facts and misconceptions*. International Council on Metals and the Environment, Ottawa (1995).
6. C. E. Renshaw, C. B. Bostick, X. Feng, Ch. K. Wong, E. S. Winston, R. Karimi, C. L. Folt, C. Y. Chen, *J. Environ. Qual.*, 35 (2006) 61.
7. H. Mielke, *Am. Sci.*, 87 (1999) 62.
8. A.C. Chamberlain, M. J. Heard, P. Little, R. D. Wiffen, *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. A*, 290 (1979) 577.
9. http://eper.eea.europa.eu/eper/emissions_pollutants.asp?CountryCode=EU25&EmissionSelectionAir=on&EmissionSelectionWaterDirect=on&EmissionSelectionWaterIndirect=on&Year=2004&PollutantId=23, consultado el 30 de Noviembre de 2010.
10. <http://www.emep-emissions.at/emission-data-webdab/emission-as-reported-by-parties/>, consultado el 30 de Noviembre de 2010.
11. G. L. Ter Haar, M. A. Bayard, *Nature*, 232 (1971) 553.
12. J. Maskall, K. Whitehead, C. Gee, I. Thornton, *Appl. Geochem.*, 11 (1996) 43.
13. A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, 3rd ed. CRC Press (2001).
14. H.A. Ruff, M. E. Markowitz, P.E. Bijur, J. F. Rosen, *Environ. Health Perspect.*, 104 (1996) 180.
15. M. B. Rabinowitz, *Environ. Health Perspect.*, 91 (1991) 33.
16. B. J. Lagerkvist, S. Ekesrydh, V. Englyst, G. F. Nordberg, H. A. Soderberg, D. E. Wiklund, *Am. J. Public Health*, 86 (1996) 1247.
17. H. Hu, L. Pepper, R. Goldman, *Am. J. Ind. Med.*, 20 (1991) 723.
18. G. W. Goldstein, *Neurotoxicology*, 14 (1993) 97.

19. T. J. B. Simons, *Neurotoxicology*, 14 (1994) 77.
20. M. J. Warren, J. B. Cooper, S. P. Wood, P. M. Shoolingin-Jordon, *Trends Biochem. Sci.*, 23 (1998) 217.
21. R. B. Sutton, B. A. Davletov, A. M. Berghuis, T. Sudhof, S. R. Sprang, *Cell*, 80 (1995) 929.
22. J. Markovac, G. W. Goldstein, *Nature*, 334 (1988) 71.
23. J. L. Tomsig, J. B. Suszkiw, *J. Neurochem.*, 64 (1995) 2667.
24. B. H. Quintanilla-Vega, D. Hoover, W. Bal, E. K. Silbergeld, M. P. Waalkes, L. D. Anderson, *Chem. Res. Toxicol.*, 13 (2000) 594.
25. E. K. Jaffe, J. Martins, J. Li, J. Kervinen, L. Roland, J. Dunbrack, *J. Biol. Chem.*, 276 (2001) 1531.
26. T. J. B. Simons, *Eur. J. Biochem.*, 234 (1995) 178.
27. Centers for Disease Control and Prevention, *Screening Young Children for Lead Poisoning: Guidance for State and Local Public Health Officials*. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (1997).
28. H. L. Needleman, A. Schell, D. Bellinger, A. Leviton, E. N. Allred *N. Engl. J. Med.*, 322 (1990) 83.
29. D. C. Bellinger, in M. Yasui, M. J. Strong, K. Ota and M. A. Verity (eds.), *Mineral and Metal Neurotoxicology*, CRC Press. New York (1997).
30. R. Nevin, *Environ. Res.*, 83 (2000) 1.
31. Centers for Disease Control and Prevention, *A Review of Evidence of Health Effects of Blood Lead Levels <10 µg/dL in Children*. Atlanta, U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service (2004).
32. R. L. Canfield, C. R. Henderson Jr., D. A. Cory-Slechta, C. Cox, T. A. Jusko, B. P. Lanphear, *N. Engl. J. Med.* 348 (2003) 1517.
33. E. Habermann, K. Crowell, P. Janicki, *Arch. Toxicol.*, 54 (1983) 61.
34. M. Alkondon, A. C. Costa, V. Radhakrishnan, R. S. Aronstam, E. X. Albuquerque, *FEBS Lett.*, 261 (1990) 124.
35. Ch. D. Toscano, T. R. Guilarte, *Brain Res. Rev.*, 49 (2005) 529.
36. L. D. White, D. A. Cory-Slechta, M. E. Gilbert, E. Tiffany-Castiglioni, N. H. Zawia, M. Virgolini, A. Rossi-George, S. M. Lasley, Y. C. Qian, Md. R. Basha, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 225 (2007) 1.

37. *Brownfields technology primer: selecting and using phytoremediation for site cleanup EPA 542-R-01-006*, Office of Solid Waste and Emergency Response, Environmental Protection Agency (2001).
38. M. G. Palmgren, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 52 (2001) 817.
39. J. M. de la Fuente, V. Ramírez-Rodríguez, J. L. Cabrera-Ponce, L. Herrera-Estrella, *Science*, 276 (1997) 1566.
40. A. Massonneau, N. Langlade, S. Leon, J. Smutny, E. Vogt, G. Neumann, E. Martinoia, *Planta*, 213 (2001) 534.
41. J. W. Huang, J. Chen, W. B. Berti, S. D. Cunningham, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 800.
42. I. Raskin, J. M. Blaylock, D. E. Salt, S. Dushenkov, O. Zakharova, C. Gussman, Y. Kapulnik, B. D. Ensley, *Environ. Sci. Technol.*, 31 (1997) 860.
43. J. W. Huang, S. D. Cunningham, *New Phytol.*, 134 (1996) 75.
44. E. M. Cooper, J. T. Sims, S. D. Cunningham, J. W. Huang, W. R. Berti, *J. Environ. Qual.*, 28 (1999) 1709.
45. Z. G. Shen, X. D. Li, C. Wang, H. M. Chen, C. Hong, *J. Environ. Qual.* 31 (2002) 1893.
46. A. Barona, I. Aranguiz, A. Elias, *Environ. Pollut.*, 113 (2001) 79.
47. W. W. Wenzel, R. Unterbrunner, P. Sommer, S. Pasqualina, *Plant Soil*, 249 (2003) 83.
48. J. Wu, F. Hsu, S. D. Cunningham, *Environ. Sci. Technol.*, 33 (1999) 1898.
49. L. Epelde, J. Hernandez-Allica, J. M. Becerril, F. Blanco, C. Garbisu, *Sci. Tot. Environ.*, 401 (2008) 21.
50. M. F. Quartacci, A. Argilla, A. J. M. Baker, F. Navari-Izzo, *Chemosphere*, 63 (2006) 918.
51. M. L. Lopez, J. R. Peralta-Videa, J. G. Parsons, T. Benitez, J. L. Gardea-Torresdey, *Environ. Sci. Technol.*, 41 (2007) 8165.
52. H. Wang, X. Shan, T. Liu, Y. Xie, B. Wei, S. Zhang, F. Han, M. T. Genuchten, *Planta*, 225 (2007) 1483.
53. J. M. Lim, A. L. Salido, D. J. Butcher, *Microchem. J.*, 76 (2004) 3.
54. B. Paulose, P. K. Jaiwal, O. P. Dhankher, in P. K. Jaiwal, R. Singh and O. P. Dhankher (eds.), *Plant Membrane and Vacuolar Transporters*, CAB International, Oxford (2008).
55. A. D. Vassil, Y. Kapulnik, I. Raskin, D. E. Salt, *Plant Physiol.*, 117 (1998) 447.

56. S. V Sahi, N. L. Bryant, N. C. Sharma, S. R. Singh, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 4676.
57. S. Samardakiewicz, A. Wozny, *Plant Soil*, 226 (2000) 107.
58. D. Meyers, G. J. Auchterlonie, R. I. Webb, B. Wood. *Environ. Pollut.*, 153 (2008) 323.
59. U. Krämer, J. D. Cotter-Howells, J. M. Charnock, A. J. M. Baker, J. A. Smith, *Nature*, 379 (1996) 635.
60. A. Pich, G. Scholz, U. W. Stephan, *Plant Soil* 165 (1994) 189.
61. M. H. M- Senden, A. J. G. van der Meer, T. G. Verburg, H. Th. Wolberbeek, *Plant Soil* 171 (1995) 333.
62. I. Schmidke, U. W. Stephan, *Physiol. Plant*, 95 (1995) 147.
63. D. G. Mendoza-Cozatl, E. Butko, F. Springer, J. W. Torpey, E. A. Komives, J. Kehr, J. I. Schroeder, *Plant J.*, 54 (2008) 249.
64. P. B. Nanda Kumar, V. Dushenkov, H. Motto, I. Raskin, *Environ. Sci. Technol.*, 29 (1995) 1232.
65. J. W. Huang, J. Chen, S. D. Cunningham, in E. L. Kruger, T. A. Anderson and J. R. Coats (eds.), *Phytoremediation of Soils and Water Contaminants*, ACS Symposium Series 664, The American Chemical Society Publication, Washington (1997).
66. M. D. Jarvis, D. W. M. Leung, *Environ. Exp. Bot.*, 48 (2002) 21.
67. Ch. Rensing, Y. Sun, Bh. Mitra, B. P. Rosen, *J. Biol. Chem.*, 273 (1998) 32614.
68. E. Grill, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Science*, 230 (1985) 674.
69. M. H. Zenk, *Gene*, 179 (1996) 21.
70. E. Grill, W. Gekeler, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *FEBS Lett.* 205 (1986) 47.
71. H. V. Scheller, B. Huang, E. Hatch, P. B. Goldsbrough, *Plant Physiol.*, 85 (1987) 1031.
72. R. Howden, Ch. R. Andersen, P. B. Goldsbrough, C. S. Cobbett, *Plant Physiol.*, 107 (1995) 1067.
73. M. Oven, J. E. Page, M. H. Zenk, T. M. Kutchan, *J. Biol. Chem.*, 277 (2002) 4747.
74. N. Tsuji, N. Hirayanagi, M. Okada, H. Miyasaka, K. Hirata, M. H. Zenk, K. Miyamoto, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (2002) 653.
75. A. Beck, K. Lenzian, M. Oven, A. Christmann, E. Grill, *Phytochemistry*, 62 (2003) 423.
76. E. Grill, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Proc. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 439.

77. O. K. Vatamaniuk, S. Mari, A. Lang, S. Chalasani, L. O. Demkiv, P. A. Rea, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 22449.
78. T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, *Plant Physiol.*, 110 (1996) 1145.
79. Z. He, J. Li, H. Zhang, M. Ma, *Plant Sci.*, 168 (2004) 309.
80. E. Grill, S. Loeffler, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Proc. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 6838.
81. O. K. Vatamaniuk, S. Mari, Y-P. Lu, P. A. Rea, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 96 (1999) 7110.
82. O. K. Vatamaniuk, S. Mari, Y-P. Lu, P. A. Rea, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 31451.
83. N. Tsuji, S. Nishikori, O. Iwabe, K. Shiraki, H. Mikayasa, M. Takagi, K. Hirata, K. Miyamoto, *Planta*, 222 (2005) 181.
84. L. E. Bennett, J. L. Burkhead, K. L. Hale, N. Terry, M. Pilon, E. A. H. Pilon-Smits, *J. Environ. Qual.*, 32 (2003) 432.
85. C. Gisbert, R. Ros, A. de Haro, D. J. Walker, P. Bernal, R. Serrano, J. Navarro-Aviñó, *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 303 (2003) 440.
86. D. F. Ortiz, T. Ruscitli, K. F. McCue, D. W. Ow, *J. Biol. Chem.*, 270 (1995) 4721.
87. Z-S. Li, Y-P. Lu, D. J. Thiele, P. A. Rea, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 94 (1997) 42.
88. M. Ghosh, J. Shen, B. P. Rosen, *Proc. Natl. Acad. Sci USA*, 96 (1999) 5001.
89. O. Gueldry, M. Lazard, F. Delort, M. Dauplais, I. Grigoras, S. Blanquet, P. Plateau, *Eur. J. Biochem.*, 270 (2003) 2486.
90. Y-P. Tong, R. Kneer, Y-G. Zhu, *Trends Plant Sci.*, 9 (2004) 7.
91. M. Morel, J. Crouzet, A. Gravot, P. Auroy, N. Leonhardt, A. Vavasseur, P. Richaud, *Plant Physiol.*, 149 (2009) 894.
92. C. T. Dameron, R. N. Reese, R. K. Mehra, A. R. Kortan, P. J. Carroll, M. L. Steigerwald, L. E. Brus, D. R. Winge, *Nature*, 338 (1989) 596.
93. D. M. Speiser, D. F. Ortiz, L. Kreppel, D. W. Ow, *Mol. Cell. Biol.*, 12 (1992) 5301.

Parte II

DETERMINACIÓN DE MODELOS DE COMPLEJACIÓN

II.

El posicionamiento ventajoso de la fitorremediación como alternativa a las técnicas ingenieriles de descontaminación, poco respetuosas con el medio ambiente, se ha ido estableciendo con los numerosos estudios provenientes de diferentes disciplinas científicas, pero cuyo fin último es siempre la mejora en su eficiencia.

Así, muchos grupos de investigación y empresas que ofertan esta técnica estudian variables de índole biológica (especies de plantas, condiciones de crecimiento, sinergia con microorganismos, y un largo etcétera) utilizando como parámetro decisorio la cantidad de metal extraído por planta o su concentración por unidad de masa vegetal en peso seco.

Otros científicos dedican su trabajo al estudio de los diferentes mecanismos de defensa frente a los diferentes tóxicos, una vertiente más bioquímica o genética que, en lo que respecta a las fitoquelatinas, intenta dar respuesta a las dudas que aún subsisten sobre su biosíntesis y modo de acción, dudas evidenciadas en el capítulo 2. En este tipo de estudios, *in vivo* o *in vitro*, generalmente se va un paso más allá y se determina tanto la cantidad de metal extraído como la distribución de fitoquelatinas sintetizadas según sea n (PC_2 , PC_3 ...).

Sin embargo, repasando sus conclusiones, surgen nuevas preguntas que aún no parecen tener una respuesta concreta. ¿Por qué el As(V) sintetiza más tioles por unidad de biomasa que el As(III) [1]? ¿Por qué ante metales tóxicos como el As(III) o el Pd(II)

las plantas sintetizan mayoritariamente PC₂ y, en cambio, con Ag(I), Cu(II) o Cd(II) se forman como mínimo hasta PC₄ [2-4]? ¿Por qué, concretando en el caso del Pb(II), las plantas contaminadas con este metal sintetizan preferentemente GSH, PC₂ y PC₃ pero difícilmente llegan a PC₄ o ligandos mayores [2, 3, 5, 6]? Si otros ácidos orgánicos y aminoácidos no tiólicos también actúan como ligandos en la homeostasis de los metales pesados, ¿qué papel pueden tener los grupos funcionales secundarios -aminas y carboxilatos- del glutatión o las PC en su mecanismo de desintoxicación?

Estos y otros tantos porqués están, por lo demás, íntimamente relacionados con el elevado coste energético asociado al proceso que va desde la reducción de un ión sulfato a una nueva transpeptidación en la síntesis de PC [7]; o dicho de otra forma y como sugieren diversos investigadores, parece que cada aumento de una unidad γ -Glu-Cys debiera estar justificado por criterios de descontaminación, esto es, por su mecanismo último de acción.

Para intentar solventar los diferentes puntos planteados, existe una tercera vía de estudio basada en realizar valoraciones complexométricas con fitoquelatinas sintéticas que se registran mediante diversas técnicas instrumentales. Este tipo de experimentos, adscritos generalmente a la química bioinorgánica o analítica, tiene por objeto el estudio de la distribución del metal pesado entre sus diversas especies o formas. Además de hallar la estequiometría de los diferentes complejos metal-PC -lo que se conoce como especiación del metal-, se pueden obtener también sus constantes de complejación, sus estabilidades termodinámicas (o, al menos, sus estabilidades relativas) y otros datos cuyo análisis pueda concluir en una secuencia de formación de los sucesivos complejos y, por ende, en una visión más detallada de la función protectora de las fitoquelatinas.

Una de las líneas de investigación del grupo de Electroanálisis -en la cual se inscribe la presente tesis- es precisamente la búsqueda de modelos de complejación para diferentes ligandos de interés medioambiental con metales tóxicos. Como es natural, nosotros utilizamos mayoritariamente técnicas electroquímicas para seguir las valoraciones, y con el propósito de conseguir la máxima y más fiable información posible del sistema en estudio, aplicamos, además, diferentes métodos quimiométricos a los datos experimentales obtenidos. Muchas veces, para tener una perspectiva más completa de la imagen dinámica del proceso de formación de los complejos, utilizamos también técnicas no electroquímicas o realizamos valoraciones más complejas,

valoraciones de competición entre metales para un solo ligando y a la inversa, diferentes ligandos para un único metal.

Obviamente, somos conscientes de que las posibles conclusiones de nuestro trabajo no son enteramente extrapolables a lo que ocurre en las plantas, pues las condiciones en un ser vivo siempre son mucho más intrincadas (como demuestra el carácter ampliamente heterogéneo de los complejos M-PC naturales), pero pueden servir para una mayor comprensión o aclaración de los resultados de experimentos *in vivo* o *in vitro*.

Así, la presente tesis doctoral aborda el estudio de la complejación de fitoquelatinas por Pb(II), una etapa más dentro de la línea de investigación sucintamente explicada. Como se irá viendo en lo que resta de memoria y dadas las dificultades que presenta el estudio de los complejos de plomo, esta tesis es más resolutive que de resultados, es decir, se presentan y desarrollan diversas herramientas que sirven para obtener los resultados aquí presentados, pero que esperamos que en el futuro puedan aplicarse también a otros experimentos más ambiciosos.

3

Valoraciones con fitoquelatinas sintéticas

En los primeros estudios *in vivo* o *in vitro* [8], la separación de los diferentes complejos metal-fitoquelatina formados en las células se efectuaba mediante cromatografía de exclusión por tamaño y, a menudo, se realizaba también una segunda separación por HPLC de fase reversa. La utilización de eluyentes de acidez elevada para evitar tiempos de retención demasiado largos conllevaba la disociación de los complejos, pues los iones H^+ compiten fuertemente con los iones metálicos por enlazarse a los grupos tiol. Una vez separados, la fracción metálica se cuantificaba por espectroscopia de absorción atómica, mientras que los ligandos se caracterizaban mediante detección UV tras una derivación post-columna con el reactivo de Ellman [9]. Más adelante, se generalizó la derivatización pre-columna con monobromobimano [10], seguida de la separación RP-HPLC y detección por fluorescencia, método con el que se consigue una sensibilidad más elevada.

La difusión de una nueva generación de detectores de masas supuso un cambio fundamental para el estudio de la especiación de metalomas, pues permiten que diferentes técnicas de separación e identificación se acoplen con el fin de mejorar tanto la selectividad como la sensibilidad para cada caso particular, obteniendo así una información estructural más completa. En cuanto a las fitoquelatinas, la separación molecular se consigue actualmente mediante HPLC (con columnas de exclusión, fase

reversa o intercambio iónico) o bien mediante electroforesis (capilar o en gel), y la caracterización mediante detectores ESI-MS o MALDI-TOF-MS [6, 11-18].

A pesar de las alternativas disponibles actualmente, los trabajos publicados acerca de una auténtica especiación de complejos metal-PC -es decir, su diferente estequiometría- son realmente escasos. La causa reside tanto en el carácter lábil de muchos de estos complejos que facilita la retención de los iones metálicos por adsorción en los *sites* del soporte de las columnas de separación, como a la dificultad de trabajar en medios no ácidos (por ejemplo, los valores del pKa de los grupos tiólicos en la PC₂ son 8,75 y 9,03 [19]). Algunas excepciones notables se han conseguido con mercurio o arsénico, cuyos complejos con fitoquelatinas tienen un carácter marcadamente más inerte y cuya fortaleza de enlace permite la utilización de eluyentes ácidos [20-23].

Así pues, el estudio de la especiación de los complejos metal-fitoquelatinas formados en las células vegetales resulta a menudo infructuoso, por lo que las valoraciones complexométricas realizadas con fitoquelatinas sintéticas resultan de gran utilidad a la hora de calcular constantes de formación o, al menos, para proponer modelos de complejación que puedan servir de ayuda a los estudios *in vivo*.

La constante de formación de un complejo puede calcularse con cualquier método capaz de medir la concentración de al menos una especie en equilibrio. La concentración de dicha especie más la composición de la disolución permiten calcular las concentraciones del resto de especies que forman parte del equilibrio y, habiendo un número suficiente de experimentos en los cuales las ratios [M]/[L] varíen de forma considerable, se puede calcular también las constantes de complejación con bastante precisión [24-26]. El método más utilizado para este tipo de determinación es el potenciométrico -llegando al 80% de las constantes publicadas-, pero también se utiliza la espectroscopia de resonancia magnética, la conductimetría, la polarografía y diversas técnicas espectroscópicas, así como el método de distribución entre dos fases o el de intercambio iónico.

Acotando a las fitoquelatinas y otras moléculas tiólicas relacionadas, podemos encontrar un número abundante de constantes publicadas para ligandos sencillos como la glicina o el glutatión [27], pero tan sólo existe un trabajo de 1998 sobre fitoquelatinas, concretamente el sistema PC₂-Cd²⁺ estudiado por potencimetría [28]. Últimamente, en el grupo de Electroanálisis hemos aplicado la técnica de valoración

isotérmica calorimétrica (ITC) al estudio de fitoquelatinas con diversos metales pesados [29, 30]. Esta técnica permite calcular constantes de estabilidad midiendo directamente la variación de calor a temperatura constante producida por la formación de un complejo. Ciertamente, el calor medido se debe a todos los procesos que se dan durante la valoración, lo que incluye la formación del complejo en estudio, pero también las interacciones del metal con el tampón utilizado, la solvatación, etcétera; de todas formas, haciendo los experimentos pertinentes, se puede contrarrestar estos fenómenos y calcular constantes de complejación con una exactitud razonable.

La determinación de una constante de complejación lleva implícito, como es lógico, un modelo de complejación, pero no siempre resulta fácil calcularla con precisión, como indica la ausencia de bibliografía en el caso de las PC. Se hace necesario entonces la búsqueda de otras metodologías que permitan extraer información de los experimentos y predecir así la secuencia de formación de los sucesivos complejos entre un metal y un ligando. La manera habitual de conseguirlo, puesta en práctica por el Dr. Mehra y seguida más tarde por otros [31-34], es realizar valoraciones de fitoquelatinas sintéticas con un metal o viceversa, registrando para cada adición un espectro diferente mediante diferentes técnicas ópticas como ultravioleta-visible, fluorescencia o dicroísmo circular. La estequiometría de los complejos formados se propone a partir del análisis visual de la ratio a la cual se produce la saturación de las bandas propias de la transferencia de carga inducida por los metales.

Este método, aunque eficaz, resulta un tanto sencillo y no parece conveniente para determinar complejos intermedios, componentes minoritarios o para reproducir situaciones que fácilmente se dan en el medio natural como la politoxicidad o la competencia entre ligandos. En contraposición, el seguimiento de estas valoraciones por alguna técnica voltamperométrica asistida por técnicas quimiométricas -como se verá en el resto de la memoria- permite generalmente extraer información más fidedigna y completa de este tipo de experimentos u otros de mayor complejidad.

4

MCR-ALS aplicado a valoraciones voltamperométricas

4.1. Aplicación de la voltamperometría a los estudios de complejación

Las técnicas voltamperométricas resultan muy útiles tanto en los estudios de especiación como en el cálculo de las constantes de estabilidad, pues son métodos directos que proporcionan información a niveles de concentración de metales muy bajos, ofrecen una fuerte dependencia de las señales con respecto a la especiación del metal, diferencian entre estados de oxidación de un mismo metal y no suelen requerir pretratamiento físico de la muestra acuosa.

La señal voltamperométrica obtenida cuando un ión metálico se encuentra en presencia de agentes complejantes depende de los fenómenos físico-químicos que tienen lugar en tres regiones diferenciadas del sistema electrodo/disolución (fig. 1). En el seno de la disolución existe siempre equilibrio químico al no afectar el proceso electrodo a las diferentes especies de la muestra, verificándose para todas ellas las constantes del sistema. Alrededor del electrodo existe una zona llamada capa de difusión donde el proceso electrodo afecta a las concentraciones de las especies, provocando su difusión a diferentes velocidades desde el seno de la disolución. La forma en que las diferentes concentraciones varían depende de la distancia al electrodo, del tiempo y del potencial aplicado como factores independientes de las especies químicas, pero también de la velocidad con que se consumen las especies electroactivas, de la velocidad de transporte

hacia el electrodo y de las reacciones que pueden transformar unas especies en otras dentro de la capa de difusión como factores propios de cada especie química.

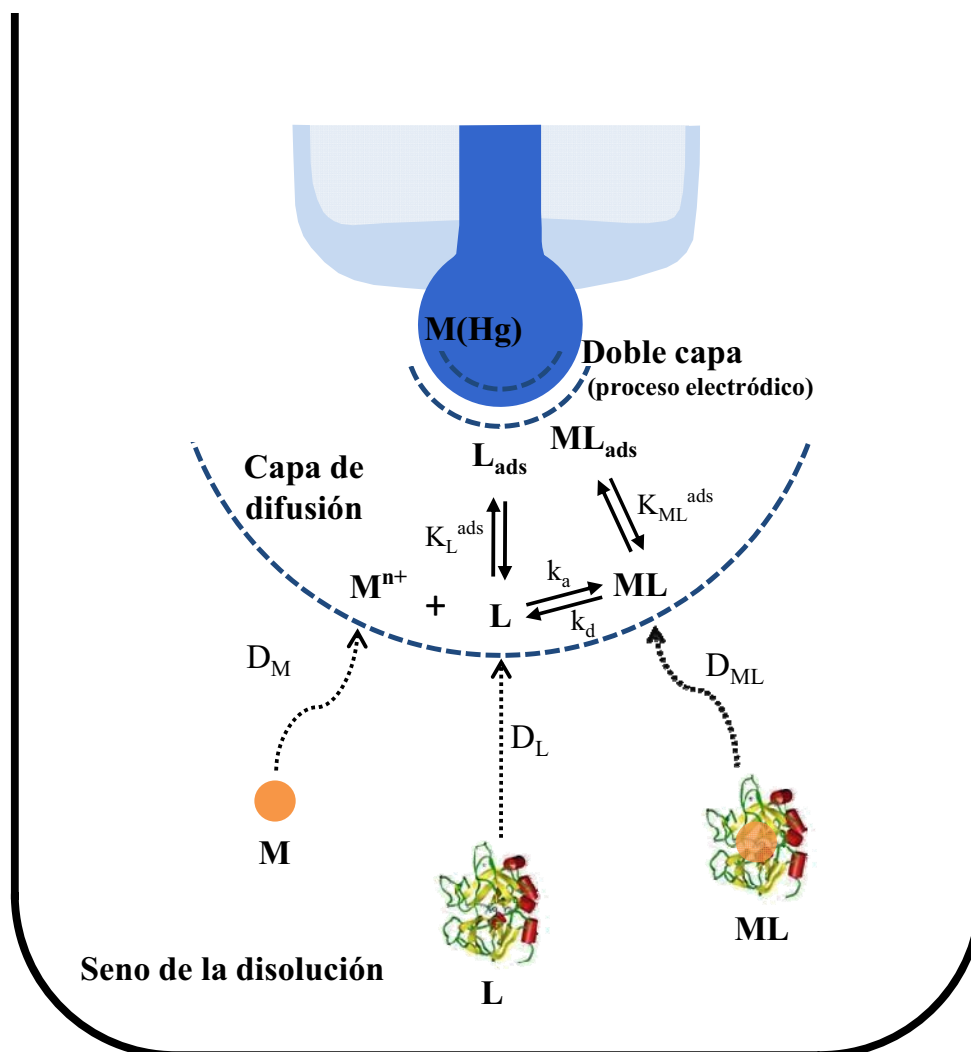


Figura 1. Procesos que tienen lugar entre un ión metálico y un ligando en cada una de las zonas de una celda electroquímica (dimensiones de las diferentes zonas no escaladas).

En el caso de los complejos, este último fenómeno está determinado por la relación entre su cinética de asociación-disociación y la ventana de tiempo de la técnica utilizada, resultando dos tipos extremos de complejos desde el punto de vista electroquímico. Se consideran complejos electroquímicamente lábiles aquellos cuya cinética de asociación-disociación es mucho más rápida que la velocidad de la medida del instrumento; esto significa que hay una interconversión continua de especies, lo que asegura un total cumplimiento de todas las constantes de estabilidad a través de la capa

de difusión y, en consecuencia, se producirá una única señal que corresponde a un promedio de la reducción de todas las especies metálicas existentes. Con los complejos electroquímicamente inertes pasa lo contrario, su cinética de asociación-disociación es más lenta que el tiempo necesario para efectuar la medida; por lo tanto, al no tener lugar la interconversión de las especies en la capa de difusión, cada especie se transporta independientemente y se reduce posteriormente en el electrodo. En muchos casos, los sistemas metal-ligando presentan una cinética de asociación-disociación del mismo orden que la ventana de tiempo de la técnica, exhibiendo así un comportamiento intermedio entre complejos lábiles e inertes que supone una dificultad añadida a la correcta interpretación de los datos experimentales.

En general, al añadir un agente complejante, la señal intensidad vs. potencial del metal evoluciona desplazándose el potencial de semionda ($\Delta E_{1/2}$) o de pico (ΔE_p) hacia potenciales más negativos y variando la intensidad límite (I_{lim}) o de pico (I_p). De todas formas y como se acaba de ver, la comprensión de estas señales resulta complicada debido a la coexistencia de diversos procesos (diferente difusión de las especies, adsorción electródica, complicaciones de tipo cinético, etcétera) que simultanean con la propia complejación.

4.2. *Hard modelling* y *soft modelling*

La aproximación clásica y más habitual de resolver los problemas electroquímicos -y, probablemente, la que aún se percibe como más rigurosa- es el ajuste de un modelo electroquímico preestablecido a unos datos experimentales. Esta metodología, conocida con el nombre de *hard modelling*, engloba tres etapas:

- i) la formulación de un modelo físico-químico hipotético que englobe los procesos electroquímicos, los fenómenos de transporte y la naturaleza de las medidas realizadas.
- ii) la resolución analítica o numérica de la formulación matemática propuesta por el modelo.
- iii) la interpretación de los datos obtenidos como términos físico-químicos que establezcan una correcta perspectiva de los procesos que tienen lugar y determinen parámetros analíticos.

Entre los diferentes modelos disponibles en la bibliografía para estudios de complejación destacan el de DeFord y Hume [35, 36], aplicable a la complejación de un metal y un ligando sencillo que da lugar a complejos lábiles sucesivos, y el de De Jong *et al.* [37-39], aplicable a la complejación de un metal y un ligando macromolecular que forman complejos 1:1 entre el metal y cada una de las posiciones complejantes. Ambos están basados en la utilización de sólo dos parámetros por cada señal polarográfica, la intensidad límite o de pico y el potencial de semionda o de pico.

La aplicación de estos modelos requiere el cumplimiento de una serie de hipótesis, entre ellas: *i)* reacción electroquímica reversible; *ii)* transporte de materia controlado por difusión; *iii)* formación de complejos electroquímicamente lábiles; *iv)* exceso de ligando respecto del ion metálico; *v)* cambios en la intensidad y/o potencial suficientemente grandes y medibles con precisión; *vi)* ausencia de fenómenos de adsorción o adsorción inducida sobre la superficie del electrodo.

En la complejación de moléculas naturales como las fitoquelatinas, la presencia de adsorción electroquímica y la formación de complejos cuyas cinéticas de asociación-disociación son lentas desde el punto de vista electroquímico son frecuentes, lo que impide la aplicación de este tipo de modelos. Por otra parte, el gran número de grupos funcionales que contienen estos ligandos originan voltamperogramas complicados, con diversas señales que incluso pueden estar solapadas. Estos comportamientos hacen necesaria la utilización de técnicas quimiométricas que permitan la extracción de información a partir del análisis numérico y estadístico de los datos experimentales sin la asunción de un modelo de complejación, lo que constituye una nueva aproximación a la resolución de problemas electroquímicos que recibe el nombre de *soft modelling*.

La quimiometría se puede aplicar en diversas etapas del análisis electroquímico y con diferentes objetivos, siendo los más comunes el diseño experimental y optimización de parámetros instrumentales; la preparación y transformación de datos para su análisis posterior; la clasificación de muestras; y la calibración, determinación de concentraciones o la identificación de un modelo. Aunque los métodos quimiométricos se aplican con más frecuencia en otras ramas de la química analítica, su uso en electroanálisis ha experimentado un notable progreso en la calibración multivariante, reconocimiento de patrones, sensores electroquímicos y series de sensores que se integran en las llamadas lenguas y narices electrónicas [40-43].

4.3. Análisis quimiométrico de sistemas multicomponente

El hecho de que la metodología *soft modelling* no necesite un modelo teórico previo permite que los sistemas en estudio sean menos restringidos o, por así decirlo, que estos tengan más libertad en su comportamiento electroquímico. Sin embargo, resulta de gran utilidad para la elección de un método quimiométrico el conocer *a priori* las posibles reacciones y señales que podemos obtener en un proceso de reducción de iones metálicos en presencia de ligandos, sobre todo teniendo en cuenta que la técnica de DPV proporciona señales para todas las especies químicas con una dependencia muy alta de la especiación del metal, como ya se dijo anteriormente.

Un esquema global de las reacciones redox que se pueden dar en un sistema metal/fitoquelatina se muestra en la figura 2.

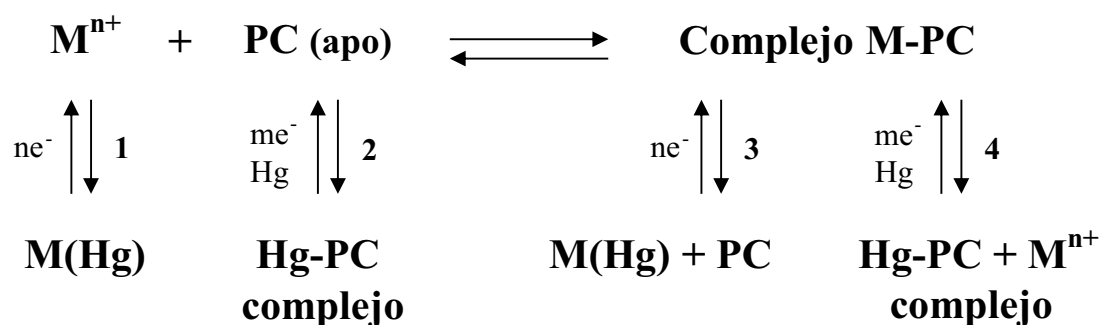


Figura 2. Esquema de las posibles reacciones de un ión metálico en presencia de fitoquelatinas. **1.** Reducción del ión metálico libre; **2.** Señal anódica de la fitoquelatina libre; **3.** Señal de reducción de los complejos M-PC; **4.** Señal anódica de los complejos M-PC.

Como se puede ver, la complejidad de los voltamperogramas en este tipo de sistemas es elevada, ya que coexisten no sólo las señales del metal libre con la de los complejos, sino que también aparecen las señales de los ligandos y complejos que están asociadas a los procesos anódicos del mercurio, aspecto que se explica más ampliamente en el siguiente capítulo. Así pues, una valoración PC/Mⁿ⁺ registrada por voltamperometría resulta un sistema multicomponente monitorizado de una forma multivariante, puesto que los datos experimentales obtenidos se pueden organizar en una matriz cuyas dos direcciones recojan, respectivamente, la variación en la composición y en la magnitud medida para todos los componentes del sistema.

La determinación de un modelo de complejación en sistemas multicomponente así analizados se puede llevar a cabo aplicando algún método quimiométrico de resolución multivariante de curvas (MCR). Estos métodos se basan en aislar, resolver y cuantificar las fuentes de variación de un conjunto de datos experimentales como un modelo aditivo de contribuciones de los componentes puros del sistema químico [44-47]. Además, MCR no requiere apenas información previa sobre el número o la naturaleza de los componentes del sistema (aunque cualquier información disponible puede ser utilizada para mejorar el análisis), y el único prerrequisito necesario para su aplicación es que la contribución de cada componente del sistema a la magnitud total medida sea lineal.

De esta forma, los métodos de resolución multivariante de curvas descomponen matemáticamente la respuesta instrumental (organizada previamente en una matriz \mathbf{I}) en un producto de dos matrices abstractas \mathbf{C} y \mathbf{V}^T , más una matriz \mathbf{X} que contiene el residual no explicado por el producto \mathbf{CV}^T (ver esquema en la figura 3). Concretamente, el método utilizado en esta tesis doctoral es *Multivariate curve resolution with alternating least squares* (MCR-ALS) -desarrollado por Tauler *et al.* [48] y explicado con detalle en el capítulo 8-, cuya principal ventaja es que permite dotar de un significado químico a las dos matrices resultantes, convirtiéndose en una herramienta muy poderosa para el estudio de los equilibrio de complejación.

En lo que respecta a la aplicación de MCR-ALS a valoraciones complexométricas que se siguen con alguna técnica voltamperométrica, la matriz \mathbf{C} resultante contiene los perfiles de concentración, mientras que la matriz \mathbf{V}^T contiene los voltamperogramas unitarios para cada componente del sistema en estudio. De la matriz \mathbf{C} es posible deducir información sobre la evolución de los diferentes procesos electroquímicos y, por tanto, de las diferentes especies existentes durante el experimento. De la matriz \mathbf{V}^T es posible deducir información acerca de las características de los procesos implicados a partir de su posición en el eje de potenciales. Por último, a partir del análisis combinado de ambas matrices se puede proponer un esquema electroquímico y deducir un modelo de complejación -una secuencia de los complejos formados- que contenga la máxima información sobre las diferentes especies químicas.

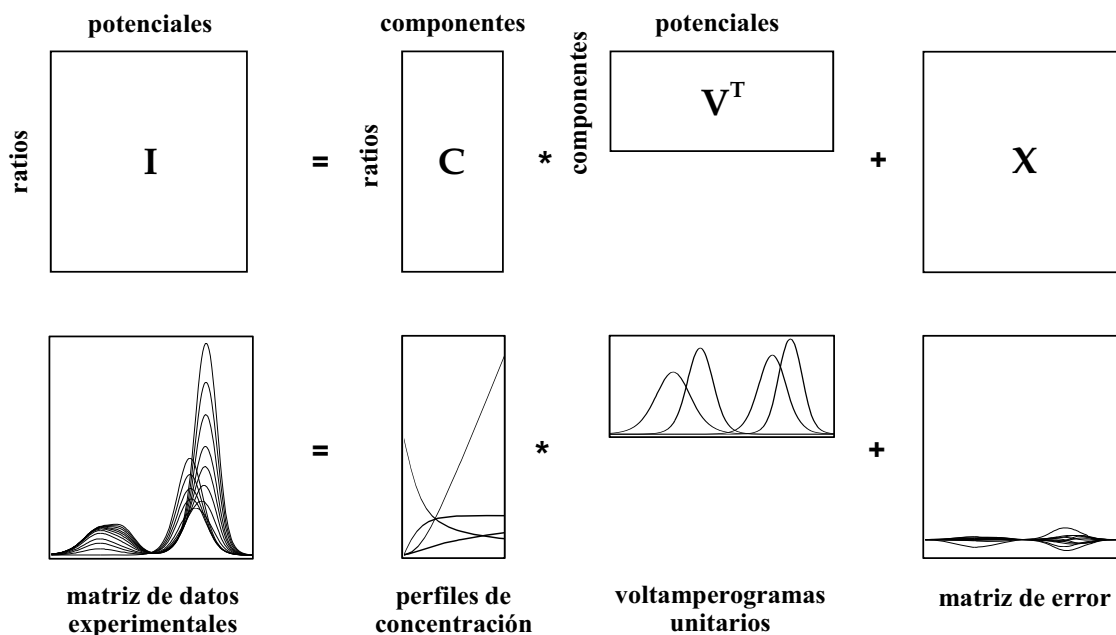


Figura 3. Resolución de un sistema voltamperométrico multicomponente (matriz **I**) en sus perfiles de concentración puros (matriz **C**) y sus voltamperogramas unitarios (matriz V^T). El nombre de las matrices no sigue la notación matricial clásica, sino la utilizada habitualmente por el grupo de Electroanálisis y, por tanto, la presentada en los artículos científicos recopilados en esta tesis.

El método MCR-ALS ha sido ampliamente aplicado al estudio voltamperométrico de la complejación de metales. En la tabla 1 podemos encontrar diversos ejemplos de sistemas que forman complejos predominantemente inertes, para los que se puede asumir plenamente la condición de linealidad entre intensidad y concentración, pero también para procesos de complejación cinéticamente lábiles cuyas desviaciones de la linealidad no son demasiado acusadas. En la misma tabla también podemos apreciar como los sistemas estudiados son cada vez más complejos, llegando a la competencia entre metales (politoxicidad) o a la competencia entre ligandos sucesivos (simulación de lo que ocurre en el citosol celular). Aparte, MCR-ALS también se ha aplicado a otros objetivos fuera de la complejación, como puede ser la detección voltamperométrica utilizando la técnica de HPLC para resolver picos solapados [50], o la selección del ángulo de fase en ACP para minimizar la corriente capacitativa [51], demostrando así la versatilidad de este método quimiométrico en su aplicación a datos electroquímicos.

Tabla 1: Selección de algunos sistemas estudiados mediante el uso combinado de técnicas voltamperométricas y MCR-ALS.

Sistemas	Técnicas	Referencias
Zn – PAA Zn – PMA	DPP, NPP, RPP, DPASV	J. M. Díaz-Cruz <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 393 (1995) 7
Cd – GSH Zn – GSH	DPP / CV DPP, NPP, RPP / DPV, SCP, AdSCP	Mendieta <i>et al.</i> , <i>Anal. Biochem.</i> , 240 (1996)134 / M. S. Díaz-Cruz <i>et al.</i> , <i>Anal. Chem.</i> , 71 (1999) 4629 J. M. Díaz-Cruz <i>et al.</i> , <i>Analyst</i> , 126 (2001) 371 / N. Serrano <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 591 (2006) 105
Pb – GSH Hg – GSH	DPP DPV	B. H. Cruz <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 516 (2001) 110 E. Chekmeneva <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 644 (2010) 20
Cd – NTA Cd- Gly Zn- Gly	DCP, DPP DPP, NPP, RPP	M. Torres <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> , 371 (1998) 23 M. Fernández <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> 505 (2001) 44
Cd - FT Cd / Zn – FT	LSV DPP, SWV	M. Esteban <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> 468 (1999) 202 M. S. Díaz-Cruz <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> 523 (2002) 114
Cd - {Zn-MT} Cd / Zn – α - / β - MT	DPP, SWV DPP	M. S. Díaz-Cruz <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> 523 (2002) 114 M. J. López <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 37 (2003) 5609
Cd – ácido húmico Cd – PC ₂	DPASV / ACP DPP	M. C. Antunes <i>et al.</i> , <i>Anal. Chim. Acta</i> , 459 (2002) 291 / A. M. Garrigosa <i>et al.</i> , <i>Electroanalysis</i> , 18 (2006) 1215 B. H. Cruz <i>et al.</i> , <i>J. Electroanal. Chem.</i> , 520 (2002) 111
Cd / Zn – PC ₃ Cd / Zn – PC ₄	DPP DPP	B. H. Cruz <i>et al.</i> , <i>Environ. Sci. Technol.</i> 39 (2005) 778 E. Chekmeneva <i>et al.</i> , <i>Electroanalysis</i> , 19 (2007) 310
Cd – Cys-Gly/PC ₂	DPP	R. Gusmao <i>et al.</i> , <i>Anal. Bioanal Chem.</i> , 394 (2009) 1137

Compuestos:

PAA, ácido poliacrílico; PMA, ácido polimetacrílico; GSH, glutatión; NTA, ácido nitrilotriacético; FT, fragmento C-terminal de metaloteoneína de mamífero: Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala; {Zn-MT}, Zn-metalotioneína de mamífero; α - o β - MT, dominios α y β de metalotioneína de mamífero, PC_n, (γ -Glu-Cys)_n-Gly.

Técnicas:

DPP, polarografía diferencial de impulsos; NPP, polarografía normal de impulsos; RPP, polarografía de impulsos inversa; DPASV, voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos; CV, voltamperometría cíclica; DPV, voltamperometría diferencial de impulsos; SCP, cronopotenciometría de redisolución; AdSCP, cronopotenciometría de redisolución con acumulación por adsorción; DCP, polarografía de corriente continua; LSV, voltamperometría de barrido lineal; SWV, voltamperometría de onda cuadrada; ACP, polarografía de corriente alterna.

5

Problemas de los sistemas PC/Pb(II)

Antes de la realización de la presente tesis, se había publicado en nuestro grupo de investigación un estudio del sistema GSH/Pb(II) aplicando MCR-ALS a los datos obtenidos de valoraciones polarográficas [52]. Entre otras conclusiones, este estudio recoge que:

- i)* el solapamiento entre picos es mucho más acusado que en sistemas donde el metal es Cd(II) o Zn(II), pues el potencial al que aparecen las señales anódicas del mercurio en presencia de GSH se sitúa en la zona de potenciales donde el plomo libre y sus complejos se reducen.
- ii)* los datos experimentales sufren una desviación del comportamiento lineal debida al desplazamiento progresivo del potencial de las señales de los complejos, y al ensanchamiento de las señales anódicas del GSH conforme aumenta su concentración.

Previsiblemente, estos problemas se podían repetir -o incluso acrecentar- al estudiar en presencia de Pb(II) otros ligandos tiólicos mayores como las fitoquelatinas.

5.1. Señales anódicas

En general, los límites del intervalo de trabajo de un electrodo dependen tanto del material de éste como de la solución empleada en la celda electroquímica. En el caso del mercurio, su límite anódico puede llegar hasta valores de potencial positivos (aproximadamente 0,5 V) cuando el medio es fuertemente ácido, pero se acorta sensiblemente en presencia de especies complejantes de los cationes Hg_2^{2+} o Hg^{2+} como se puede ver, a modo de ejemplo, en la figura 1.

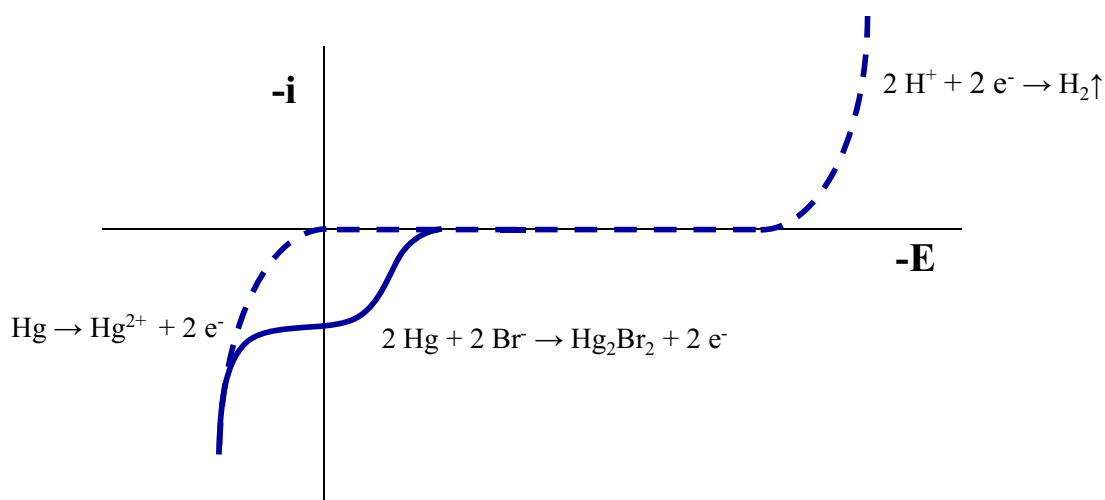
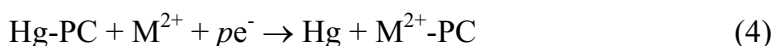


Figura 1. Representación del intervalo de trabajo para un electrodo de mercurio en medio KNO_3 (línea discontinua) y KBr (línea continua), donde el límite anódico es menor debido al efecto complejante del ion bromuro.

Este es el caso de los compuestos que contienen grupos funcionales sulfhidrilo, como los péptidos con algún resto aminoacídico de cisteína. Por ejemplo, la polarografía de la forma reducida del glutatión, $\gamma\text{-Glu-Cys-Gly}$, presenta dos señales anódicas [53]. La primera señal, bien definida, correspondería a la formación de un compuesto mercurioso (1), mientras que la segunda señal se debe a la formación de un compuesto mercúrico donde el Hg(II) está enlazado tanto a un grupo carboxílico como a un grupo tiol (2). Las reacciones propuestas para justificar ambas señales anódicas son:



Del mismo modo, cuando el potencial previo al impulso DPV es suficientemente positivo como para oxidar el mercurio, otros tiolatos de mercurio pueden formarse con moléculas que contengan grupos tiol, [54-57]; entonces, al realizar un barrido reductor tienen lugar dos clases de procesos que, escritos para las fitoquelatinas, serían:



originándose las señales del ligando libre (3) y del complejo (4) que están relacionadas con los procesos anódicos del mercurio [58], como ya se indicó en la figura 2 del anterior capítulo.

El valor del potencial de pico, la forma, la reversibilidad e incluso la propia existencia de estas señales están afectadas por el pH, la naturaleza del tampón o la concentración del ligando, por lo que resultan señales poco previsibles y que fácilmente pueden dificultar el estudio de un proceso de complejación. Esto es especialmente apreciable en el caso del Pb(II), pues estas señales suelen aparecer en su zona de reducción y la de sus complejos, de forma que el solapamiento entre ellas puede ser considerable, a veces casi total.

5.2. Solapamiento de señales

Los primeros estudios en lo que se aplican métodos quimiométricos a datos electroanalíticos se centran, precisamente, en la resolución de señales solapadas [59, 60]. Estos métodos de deconvolución, como el filtro de Kalman o la transformada de Fourier, tratan las señales individualmente, es decir, voltamperograma a voltamperograma.

Sin embargo, las valoraciones complexométricas son sistemas cuyos componentes pueden estar solapados de dos formas, según estén distribuidos dentro de las llamadas ventana voltamperométrica y ventana de concentración. Así, dentro de la ventana voltamperométrica, dos especies están solapadas si sus señales tienen valores de potencial excesivamente cercanos en un mismo voltamperograma; dentro de la ventana de concentración, dos especies están solapadas si coexisten en las mismas regiones de la

valoración, es decir, si originan señales -por alejados que estén sus potenciales- para las mismas ratios $[M]/[L]$.

La bondad del análisis mediante cualquier método de resolución multivariante de curvas (MCR) depende, como es lógico, de la complejidad del sistema multicomponente, lo que incluye especialmente el solapamiento entre los diferentes componentes. Así, una vez realizada la factorización de la matriz experimental (\mathbf{I}), la capacidad de obtener voltamperogramas únicos (\mathbf{V}^T) y perfiles de concentración (\mathbf{C}) correctos para cada componente depende de su grado de solapamiento tanto en la ventana de concentración como en la ventana voltamperométrica. Dos teoremas concretan las condiciones necesarias para la correcta resolución de los perfiles puros de un componente [61]:

- i) Se puede obtener el perfil de concentración real de un compuesto cuando todos los compuestos que están dentro de su ventana de concentración se encuentran también fuera.
- ii) Se puede obtener el voltamperograma unitario real de un compuesto si su ventana de concentración no está completamente contenida dentro de la ventana de concentración de otro compuesto.

Estos teoremas están expresados para el solapamiento de componentes en la ventana de concentración pero se podrían formular de forma análoga si se considera la ventana voltamperométrica.

Por último, precisar que el solapamiento entre señales no se da exclusivamente entre aquellas que provienen de los procesos anódicos del mercurio y el resto pero, como es obvio, cuantos más procesos redox existan, más fácilmente puede obtenerse un alto grado de solapamiento. Además, algunas señales anódicas pueden ofrecer una información muy valiosa como es el caso de las originadas por los ligandos libres, pero no así las asociadas a la formación de complejos.

5.3. Pérdida de linealidad

Los métodos MCR se basan en la asunción de una respuesta instrumental bilineal, es decir, que cada especie química contribuye independientemente a la corriente medida en

una magnitud proporcional a su concentración. Sin embargo, en las medidas electroquímicas, la falta de linealidad entre señales y concentración en el seno de la disolución es, sino frecuente, sí mucho más habitual que al utilizar técnicas espectroscópicas. Esto se debe -como se vio anteriormente- a que la intensidad medida en la superficie del electrodo depende de diversos fenómenos físico-químicos y cinéticos que se dan en la capa de difusión, aparte de la reacción de transferencia de electrones.

La causa más frecuente de pérdida de linealidad en las valoraciones complexométricas con fitoquelatinas es la formación de complejos electroquímicamente lábiles (equilibrio de asociación-disociación mucho más rápido que el tiempo de medición), pues la continua interconversión de especies durante la medida provoca un progresivo desplazamiento lateral de las señales conforme aumenta la fracción complejada de metal libre. En otras ocasiones, el desplazamiento lateral de señales se debe a la reducción irreversible de algunos metales y/o sus complejos a causa de una transferencia lenta de los electrones en la superficie del electrodo [62]. La aplicación de MCR-ALS en estos casos es posible siempre que la desviación de la linealidad sea pequeña [49, 63], pero incluso siendo moderada y a costa de una mayor falta de ajuste, se puede llegar a resultados razonablemente satisfactorios [64].

Por otra parte, las señales asociadas a los procesos anódicos del mercurio varían con frecuencia sus parámetros electroquímicos, bien sea el valor del potencial de pico, la anchura de pico o la intensidad de la señal, produciéndose también una desviación del comportamiento lineal de los datos experimentales. El potencial al que aparecen estas señales anódicas depende del enlace mercurio-ligando y de los equilibrios en los que está implicado el ligando (normalmente equilibrios ácido-base y de complejación con otros metales) pero, como ya se ha dicho, suelen situarse en la zona de potenciales donde el plomo y sus complejos se reducen, por lo que no es posible prescindir de ellas en el tratamiento quimiométrico.

Por último, existen otros fenómenos como la adsorción de ligandos o complejos sobre la superficie del electrodo que pueden provocar corrientes capacitativas y, por tanto, importantes derivas de diferentes señales o bien distorsiones de la línea base. Aunque en el siguiente capítulo se explica con más detalle, conviene recordar ahora que la intensidad de corriente que se mide en voltamperometría tiene dos contribuciones

diferenciadas: una contribución o componente faradaica (I_f) y otra capacitativa o de carga (I_c). La componente faradaica corresponde a la corriente debida a los procesos redox que tienen lugar en la interfase electrodo-disolución, provengan estos de analitos o bien de impurezas del medio (corriente faradaica residual). La componente capacitativa responde a la aparición de una distribución de cargas a ambos lados de la interfase como consecuencia de la aplicación de un potencial o, lo que es lo mismo, de la aparición de un condensador ficticio en la interfase electrodo-solución.

Aunque MCR no pueda utilizarse cuando la desviación de la linealidad es grande, los sistemas no lineales también pueden modelarse utilizando otros métodos quimiométricos como *Artificial Neural Networks* (ANN). ANN utiliza cualquier función continua que sea adecuada para modelar un sistema lineal o no lineal, produciendo un gran número de variables latentes y de modelos diferentes para un mismo sistema [65]. Esto conlleva que ANN necesite un gran número de experimentos hasta conseguir un buen modelo de calibración, aunque la implementación de algoritmos genéticos ha incrementado su eficiencia [66]. En cuanto al estudio de la complejación de metales, ANN se ha aplicado tanto a la formación de complejos inertes como lábiles proporcionando valores de constantes de estabilidad bastante precisos [67, 68].

Referencias II

1. S. Tu, L. Q. Ma, G. E. MacDonald, B. Bondada, *Environ. Exp. Bot.*, 51 (2004) 121.
2. E. Grill, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Proc. Acad. Sci. USA*, 84 (1987) 439.
3. T. Maitani, H. Kubota, K. Sato, T. Yamada, *Plant Physiol.*, 110 (1996) 1145.
4. S. Heiss, A. Wachter, J. Bogs, C. Cobbett, T. Rausch, *J. Exp. Bot.*, 54 (2003) 1833.
5. M. Gupta, U. N. Rai, R. D. Tripathi, P. Chandra, *Chemosphere*, 30 (1995) 2011.
6. G. Scarano, E. Morelli, *BioMetals*, 15 (2002) 145.
7. J. C. Steffens, *Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.*, 41 (1990) 53.
8. W. E. Rauser, *Annu. Rev. Biochem.*, 59 (1990) 61.
9. H. V. Scheller, B. Huang, E. Hatch, P. B. Goldsbrough, *Plant Physiol.*, 85 (1987) 1031.
10. A.M. Svardal, M.A. Mansoor, P.M. Ueland, *Anal. Biochem.*, 184 (1990) 338.
11. I. Leopold, D. Günther, *Fresenius J. Anal. Chem.*, 359 (1997) 364.
12. V. Vacchina, K. Polec, J. Szpunar, *J. Anal. At. Spectrom.*, 14 (1999) 1157.
13. S. Mounicou, V. Vacchina, J. Szpunar, M. Potin-Gautier, R. Lobinski, *Analyst*, 126 (2001) 624.
14. M. H. A. El-Zohri, R. Cabala, H. Frank, *Anal. Bioanal. Chem.*, 382 (2005) 1871.
15. M. Pérez-Rama, E. T. Vaamonde, J. A. Alonso, *Electrophoresis*, 26 (2005) 610.
16. S. Iglesia-Turiño, A. Febrero, O. Jauregui, C. Caldelas, J. L. Araus, J. Bort, *Plant Physiol.*, 142 (2006) 742.
17. B.B.M. Sadi, A. P. Vonderheide, J-M Gong, J. I. Schröder, J. R. Shann, J. A. Caruso, *J. Chromatogr. B*, 861 (2008) 123.
18. R. Minocha, P. Thangavel, O. P. Dhankher, S. Long, *J. Chromatogr. A*, 1207 (2008) 72.
19. S. P. McGrath, S. J. Dunham, R. L. Correll, in N. Terry and G. Bañuelos (eds.), *Phyoremediation of contaminated soil and water*, CRC Press, Boca Raton (2000).
20. T-Y. Yen, J. A. Villa, J. G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.*, 34 (1999) 930.
21. A. Raab, J. Feldmann, A. A. Meharg, *Plant Physiol.*, 134 (2004) 1113.
22. A. P. Navaza, M. Montes-Bayón, D. L. LeDuc, N. Terry, A. Sanz-Medel, *J. Mass Spectrom.*, 41 (2006) 323.
23. L. Chen, L. Yang, Q. Wang, *Metallomics*, 1 (2009) 101.

24. J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an Analytical Approach*, Ellis Horwood, Chichester (1988).
25. A. E. Martell, R. D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions*, Springer, New York (1996).
26. A. Tessier, D. R. Turner, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons, Chichester, 1995.
27. L.D. Pettit, K. Powell, IUPAC Stability Constants Database, v. 5.16, Academic Software, Otley (2001).
28. J. Johanning, H. Strasdeit, *Angew. Chem. Int. Ed.*, 37 (1998) 2464.
29. E. Chekmeneva, R. Prohens, J. M. Díaz Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Biochem.*, 375 (2008) 82.
30. E. Chekmeneva, J. M. Díaz Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 7010.
31. R. K. Mehra, P. Mulchandani, *Biochem. J.*, 307 (1995) 697.
32. R. K. Mehra, K. Tran, G. W. Scott, P. Mulchandani, S. S. Saini, *J. Inorg. Biochem.*, 61 (1996) 125.
33. W. Bae, R. K. Mehra, *J. Inorg. Biochem.*, 68 (1997) 201.
34. Y. Cheng, Y-B Yan, J. Liu, *J. Inorg. Biochem.*, 99 (2005) 1952.
35. D. D. DeFord, D. N. J. Hume, *J. Amer. Chem. Soc.*, 73 (1951) 5321.
36. I. Leden, *Z. Phys. Chem.*, 188 (1941) 160.
37. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, K. Holub, *J. Electroanal. Chem.*, 234 (1987) 1.
38. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 234 (1987) 17.
39. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 235 (1987) 1.
40. V. Pravdova, M. Pravda, G. G. Guilbault, *Anal. Lett.*, 35 (2002) 2389.
41. E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Electroanalysis*, 14 (2002) 1533.
42. Y. Ni, S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, 626 (2008) 130.
43. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, in S. D. Brown, R. Tauler and B. Walczak (eds.), *Comprehensive Chemometrics vol. 4, Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier Science, Oxford (2009).
44. W. H. Lawton, E. A. Sylvestre, *Technometrics*, 13 (1971) 617.
45. E. A. Sylvestre, W. H. Lawton, M. S. Maggio, *Technometrics*, 16 (1974) 353.
46. O. S. Borgen, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 174 (1985) 1.
47. O. S. Borgen, N. Davidsen, M. Y. Zhu, O. Oyen, *Mikrochim. Acta*, 2 (1986) 1.

48. R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 18 (1993) 293.
49. J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B. S. Grabaric, M. Esteban, E. Casassas, *J. Electroanal. Chem.*, 393 (1995) 7.
50. O. González-García, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *J. Chromatogr. A*, 1062 (2005) 95.
51. A. M. Garrigosa, A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Electroanalysis*, 18 (2006) 2405.
52. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *J. Electroanal. Chem.*, 516 (2001) 110.
53. W. Stricks, I. M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4646.
54. I. M. Kolthoff, C. Barnum, *J. Am. Chem. Soc.*, 62 (1940) 3061.
55. C. A. Mairesse-Ducarmois, G. J. Patriarche, J. L. Vandenbalck, *Anal. Chim. Acta*, 71 (1974) 165.
56. J.M. Séquaris, *Comp. Anal. Chem.*, 27 (1992) 115.
57. M. Heyrovský, P. Mader, V. Veselá, M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.*, 369 (1994) 53.
58. E. Casassas, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.*, 194 (1985) 11.
59. T. F. Brown, S. D. Brown, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1410.
60. B. S. Grabaric, R. J. O'Halloran, D. E. Smith, *Anal. Chim. Acta*, 133 (1981) 349.
61. R. Manne. *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 27 (1995) 89.
62. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *TrAc, Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 49.
63. M. Fernández, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler. M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 505 (2001) 44.
64. M. S. Díaz-Cruz, J. M. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, *Anal. Biochem.*, 279 (2000) 189.
65. F. Despagne, D. L. Massart, *Analyst*, 123 (1998) 157.
66. E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 61 (2002) 35.
67. I. Cukrowski, J. Havel, *Electroanalysis*, 12 (2000) 1481.
68. I. Cukrowski, M. Farkova, J. Havel, *Electroanalysis*, 13 (2001) 295.

Parte III

METODOLOGÍA APLICADA

III.

Hoy en día, existe tal cantidad de técnicas instrumentales al alcance del investigador analítico que, *a priori*, parece que pudieran dar respuesta a todas las cuestiones que éste se plantee. Sólo dentro del grupo de técnicas clasificadas como voltamperométricas se puede elegir, por ejemplo, entre diversas señales de excitación que permiten acometer o sortear un problema concreto, añadir una etapa previa de preconcentración que mejore la sensibilidad o simplemente cambiar el material del electrodo de trabajo donde se dan las reacciones redox.

Por supuesto, conforme ha avanzado la tecnología también ha avanzado la complejidad de las investigaciones, así que llegar a esclarecer las incógnitas suscitadas puede ser hoy en día igual de arduo que en tiempos pasados. A veces no se trata de elegir tal o cual técnica, sino de predecir -conjeturar más bien- qué información nos va a dar cada una y utilizar varias de ellas en beneficio propio, de la misma manera que ayuda recurrir a prácticas de otras disciplinas diferentes a la química, como la estadística o la quimiometría.

En esta sección se describen las técnicas instrumentales más utilizadas en la realización de la presente tesis doctoral, tanto las electroquímicas como las espectroscópicas; también se describen los diferentes electrodos de trabajo empleados. Estas técnicas permiten un análisis cuantitativo de diferentes parámetros referentes al analito, pero dada la naturaleza eminentemente cualitativa de los estudios de

complejación aquí presentados, no expondremos las diferentes fórmulas en que se sustenta dicho análisis cuantitativo.

Por otra parte, el propio diseño de las valoraciones complexométricas -en las cuales se hace un barrido por cada adición- origina datos multivariantes de los que no resulta fácil extraer información útil. Para ello, nos ayudamos de algunas técnicas quimiométricas como la resolución multivariante de curvas cuya optimización se realiza mediante el método iterativo de mínimos cuadrados alternados. Este método quimiométrico es muy versátil y permite analizar conjuntamente los datos de experimentos llevados a cabo con técnicas muy diferentes como, por ejemplo, voltamperometría y dicroísmo circular. De algún modo, se posibilita que estas técnicas difíciles de acoplar experimentalmente puedan hacerlo desde el punto de vista del análisis de datos.

6

Técnicas instrumentales

6.1. Voltamperometría

Las técnicas voltamperométricas se basan en la aplicación de una señal de excitación (rampa de potencial) a una celda electroquímica que contiene un sistema microelectrónico y la solución de electrolito en estudio. Esta señal de excitación genera una respuesta en forma de intensidad de corriente que es función de los potenciales redox de las especies electroactivas y de la velocidad de transferencia de materia en la doble capa [1], además de otros parámetros menos influyentes. Esta técnica se utiliza con electrodos muy diversos (tanto en material como en forma) y recibe el nombre de polarografía cuando se utiliza un electrodo de gotas de mercurio como electrodo de trabajo.

La voltamperometría tiene su origen en el año 1922, cuando el químico checo Jaroslav Heyrovský desarrolló la polarografía clásica utilizando un electrodo de gotas de mercurio [2], investigaciones que le hicieron merecedor del Premio Nobel de Química en 1959. Por esas fechas, algunas técnicas espectroscópicas ya empezaban a superar el límite de detección proporcionado por la polarografía clásica, pues su sensibilidad está notablemente afectada por la corriente de tipo capacitativa.

Para mejorar la sensibilidad y la selectividad del método clásico, se idearon modificaciones basadas principalmente en superponer rampas de impulsos de potencial al barrido lineal típico de la polarografía clásica, permitiendo así una respuesta realizada

de la contribución faradaica frente a la capacitativa [3]. Como muestra la figura 1, tras la aplicación de un salto de potencial se produce una intensidad de corriente cuya componente capacitativa desaparece en 1 ó 2 milisegundos, mucho más rápidamente que la respuesta faradaica. Concretamente, para un electrodo de gotas de mercurio estacionario (donde el transporte de las especies electroactivas se da en régimen de difusión lineal) esta diferenciación viene definida por la ecuación de Cottrell, disminuyendo así la intensidad faradaica según la inversa de la raíz cuadrada del tiempo ($I_f \propto t^{-1/2}$), mientras que la intensidad capacitativa o de carga lo hace según la inversa de su raíz cúbica ($I_c \propto t^{-1/3}$).

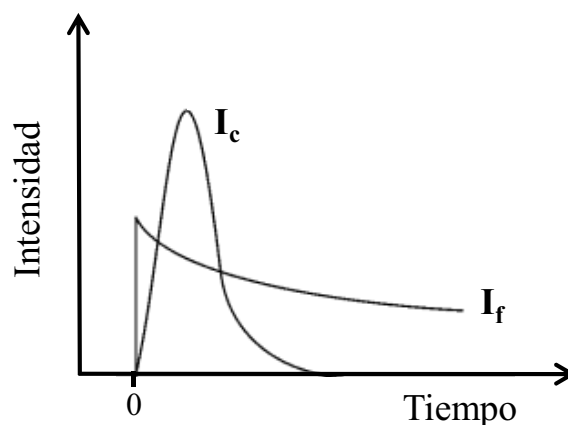


Figura 1. Evolución de la componente capacitativa I_c y faradaica I_f después de aplicar un salto de potencial ($t = 0$) en un electrodo SMDE.

Sirviéndose de este concepto teórico, se desarrollaron diferentes variantes voltamperométricas de impulsos: voltamperometría normal de impulsos, voltamperometría de onda cuadrada, voltamperometría de corriente alterna y voltamperometría diferencial de impulsos [4, 5], etcétera. La mejora de las prestaciones, el bajo coste de la instrumentación y la creciente utilización de nuevos electrodos ha resultado en un resurgimiento del interés por aplicar los métodos voltamperométricos a la determinación cuantitativa de gran variedad de compuestos -en particular en el campo farmacéutico, ambiental y biológico-, así como a la caracterización de procesos redox en diferentes medios, de la adsorción sobre superficies, de los mecanismos de transferencia de electrones y de la especiación metálica [4-8].

6.1.1. Voltamperometría diferencial de impulsos

Para la realización de la presente tesis se han utilizado, ocasionalmente, diversas técnicas voltamperométricas de impulsos, pero es la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) la técnica escogida para realizar las valoraciones de complejación, al permitir llegar a concentraciones más cercanas a las del medio celular ($\leq 10^{-5}$ mol L⁻¹ en ligando) y ofrecer una fuerte dependencia de sus señales con la especiación del metal.

La señal de excitación aplicada en un barrido por DPV (fig. 2a) es una rampa lineal de potencial a la cual se han superpuesto impulsos de potencial de amplitud constante ($\Delta E = 20\text{-}100$ mV) a intervalos de tiempo también constantes ($t_d = 1\text{-}2$ s); la duración de estos impulsos (t_p) suele estar entre los 50 y 100 ms.

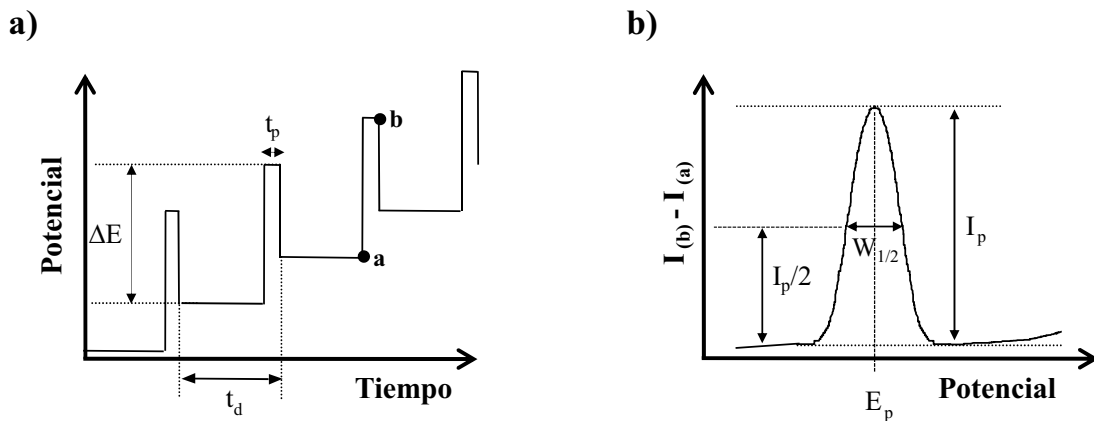


Figura 2. Señal de excitación (a) y respuesta analítica (b) de la voltamperometría diferencial de impulsos.

Durante el experimento la intensidad de corriente se mide justo antes de aplicar cada impulso de potencial (I_a) y justo antes de que estos finalicen (I_b), y se representa el valor de su diferencia ($I_b - I_a$) frente al potencial base, obteniéndose así un perfil de intensidad de corriente en forma de pico (fig. 2b). Esta señal analítica, que llamamos voltamperograma, tiene una altura (I_p) directamente proporcional a la concentración del analito en el seno de la disolución, aunque también aumenta con la amplitud del pulso e incluso valores excesivos de ésta producen distorsiones en los picos. Por otra parte, cuando el proceso es reversible, los picos son simétricos y presentan una anchura a media altura ($W_{1/2}$) característica que depende del impulso aplicado.

La voltamperometría diferencial de impulsos permite determinar concentraciones del orden de 10^{-8} mol L⁻¹ por la ya referida minimización de la intensidad capacitativa y porque medir diferencias de intensidades a potenciales tan próximos mejora considerablemente la relación señal:ruido. Por último, decir que también la selectividad es mejor en DPV que en otras técnicas de impulsos, pues la forma de pico del voltamperograma mejora la resolución entre especies [3-5].

6.2. Técnicas de redisolución

La voltamperometría de redisolución es una técnica electroquímica muy sensible utilizada para el control de un amplio rango de metales y sustancias orgánicas en el ámbito toxicológico, farmacológico, medioambiental, etcétera. Dependiendo de la matriz y si la contaminación se minimiza, las técnicas de redisolución alcanzan límites de detección inferiores a 10^{-11} mol L⁻¹, gracias a la combinación de una primera etapa de preconcentración del analito en el electrodo con una etapa posterior de redisolución en la que se genera una respuesta analítica favorable.

Existen diferentes tipos de voltamperometría de redisolución según la naturaleza de la deposición en el electrodo (adsorción, electródica, transferencia mecánica) y del tipo de señal de excitación aplicada al medir [9, 10]. En esta tesis se han escogido las técnicas de voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos (DPASV) y de cronopotenciometría de redisolución a corriente constante (CCSCP) para estudiar el desdoblamiento de la señal de algunos metales al realizar medidas con un electrodo de película de bismuto, pero también con el propósito de estudiar en un futuro próximo la complejación de ligandos de interés con metales pesados. Por otra parte, algunos estudios de complejación de ligandos tiólicos utilizando técnicas de redisolución y electrodos de película de mercurio refieren problemas de adsorción [11, 12], por lo que ensayar estos mismos sistemas con electrodos de bismuto podría mejorar este aspecto.

6.2.1. Voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos

La voltamperometría de redisolución anódica (ASV) es la técnica más utilizada en el análisis de especies metálicas por redisolución. Cada medida por ASV comprende tres etapas:

- i) *Preconcentración*: el metal se deposita en el electrodo de trabajo mediante la aplicación de un potencial 0,3-0,5 V más negativo que el potencial de reducción del ion metálico más fácilmente oxidable a determinar. Este proceso de reducción y concentración en el electrodo tiene lugar por difusión y convección.
- ii) *Reposo*: se sigue aplicando el mismo valor de potencial de deposición pero sin agitación mecánica. Esta etapa es prescindible dependiendo del electrodo de trabajo utilizado [4].
- iii) *Redisolución*: es la etapa de medida, en la cual se disuelve total o parcialmente el depósito de analito amalgamado en el electrodo aplicando un barrido de impulsos de potencial.

En la figura 3 podemos observar el potencial aplicado y la señal obtenida para un experimento por DPASV, perfiles que no se diferencian de sus análogos en DPV exceptuando, obviamente, la aplicación previa del potencial de deposición y la dirección del barrido de potencial. Gracias a esta primera etapa, se consiguen factores de preconcentración en el electrodo de entre 100 y 1000 [5], aunque sólo una pequeña fracción del analito presente en la disolución llega a amalgamarse.

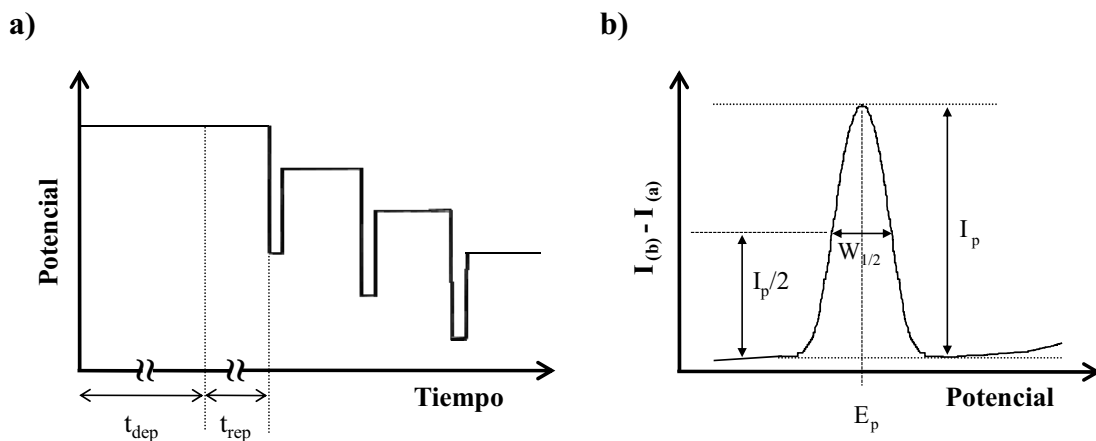


Figura 3. Señal de excitación (a) y respuesta analítica (b) de la voltamperometría de redisolución anódica diferencial de impulsos.

6.2.2. Cronopotenciometría de redisolución a corriente constante

La cronopotenciometría de redisolución, también conocida como análisis potenciométrico por redisolución (PSA), difiere de la ASV en el método utilizado para

redisolver el metal amalgamado y en que la magnitud registrada es la variación del potencial del electrodo de trabajo con el tiempo.

Tras la deposición electródica, se desconecta el control potencioestático y se redisuelven los metales, bien aplicando una intensidad constante de oxidación, bien mediante la acción de un oxidante químico como Hg(II) u oxígeno [13]. En la figura 4a se muestra la evolución del potencial con el tiempo al aplicar una intensidad de oxidación constante a un electrodo de trabajo donde previamente se han preconcentrado dos metales. Al principio, el valor del potencial disminuye drásticamente hasta alcanzar el equilibrio entre la forma reducida del primer metal (amalgamado) y la forma oxidada (en solución), pues la corriente aplicada se utiliza para redisolver el metal. Conforme se va agotando el metal reducido en la superficie del electrodo, el valor del potencial vuelve a disminuir hasta llegar al equilibrio redox del segundo metal, el más difícil de oxidar. El tiempo transcurrido mientras el potencial se mantiene constante es el principal parámetro analítico de esta técnica, y se le denomina tiempo de transición (τ).

Aunque se registre la variación del potencial con el tiempo, normalmente es preferible representar su derivada para obtener un cronopotenciograma con señales en forma de pico (fig. 4b), pues sus áreas son el tiempo de transición y, además, en este formato es posible eliminar la contribución capacitativa mediante la sustracción de la línea base.

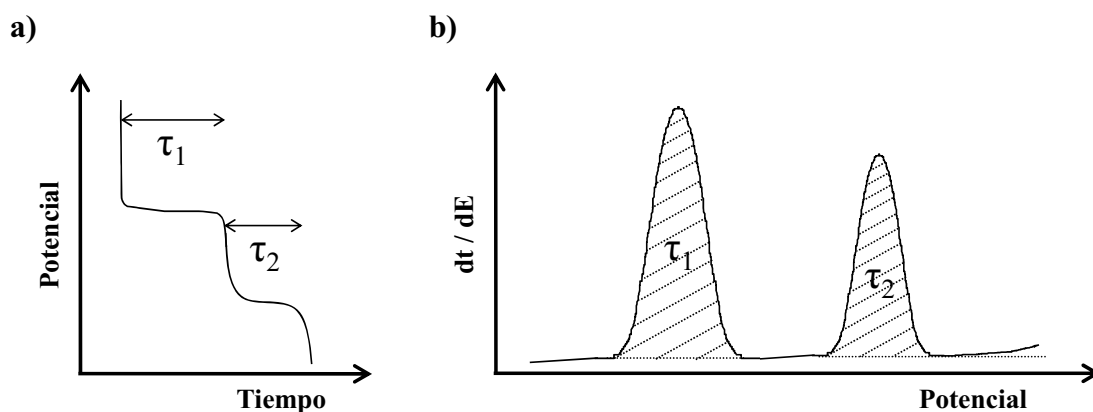


Figura 4. Medida del potencial durante la etapa de redisolución (a) y respuesta analítica (b) para un experimento con dos metales por cronopotenciometría de redisolución a corriente constante.

6.3. Dicroísmo circular

Un espectropolarímetro es el instrumento que puede producir una mezcla de luz polarizada circularmente a la derecha y a la izquierda con la misma fase e intensidad. Este proceso comienza por la emisión de luz por una fuente, generalmente una lámpara de arco de xenón, que se enfoca con espejos y rendijas para obtener una radiación monocromática. Entonces, la radiación atraviesa un prisma Rochon que la convierte en luz linealmente polarizada, es decir, que vibra en un plano único, y mediante un modulador fotoelástico este haz de luz se transforma en radiación circularmente polarizada que pasa directamente al compartimiento donde se encuentra la muestra [14, 15]. Se dice que una sustancia es ópticamente activa si un haz de luz circularmente polarizado provoca un cambio en su configuración electrónica molecular desde el estado fundamental a un estado excitado, de forma que absorbe desigualmente ambos componentes polarizados a la derecha y a la izquierda (fig. 5); esta diferencia de absorción es la magnitud conocida como dicroísmo circular.

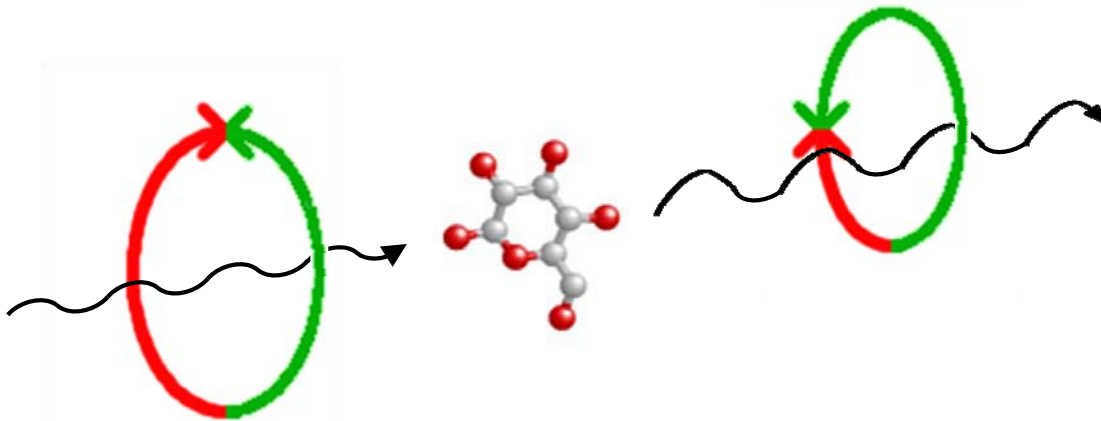


Figura 5. Absorción preferencial del componente polarizado circularmente a la derecha de un haz de luz que interacciona con una molécula de glucosa.

La actividad óptica se manifiesta cuando una molécula contiene algún centro quiral (átomo unido a cuatro sustituyentes diferentes) como es el caso de proteínas, ácidos nucleicos, azúcares, hormonas y, en general, todos los productos naturales. En lo que respecta a las proteínas, este centro quiral se encuentra en cada aminoácido -su unidad básica estructural- pues contienen un átomo de carbono llamado α (carbono adyacente al grupo carboxilo) unido a un hidrógeno, un grupo amino ($-\text{NH}_2$), un grupo carboxilo (-

COOH) y un radical orgánico R de naturaleza diversa. Cuando los aminoácidos se unen para formar las proteínas, mediante un enlace covalente llamado enlace peptídico, no se pierde la quiralidad en el carbono α , siendo así que las proteínas o polipéptidos como las fitoquelatinas mantienen la actividad óptica y son susceptibles de proporcionar un espectro mediante la técnica de dicroísmo circular.

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta lejano (180 - 250 nm) y cercano (250 - 400 nm) de la radiación electromagnética. Las señales que aparecen en la primera región están dominadas por las contribuciones del enlace peptídico e indican la estructura secundaria de las proteínas, mientras que las señales que aparecen en el UV cercano informan generalmente de la estructura terciaria de las proteínas, las contribuciones de las uniones entre cadenas y las transiciones de electrones d-d de los grupos prostéticos [16]. Así, como se puede ver en la figura 6, las señales CD de las fitoquelatinas libres aparecen en el UV lejano, pero las de sus complejos con metales suelen aparecer en el UV cercano, zona extremadamente sensible a los cambios en la conformación espacial.

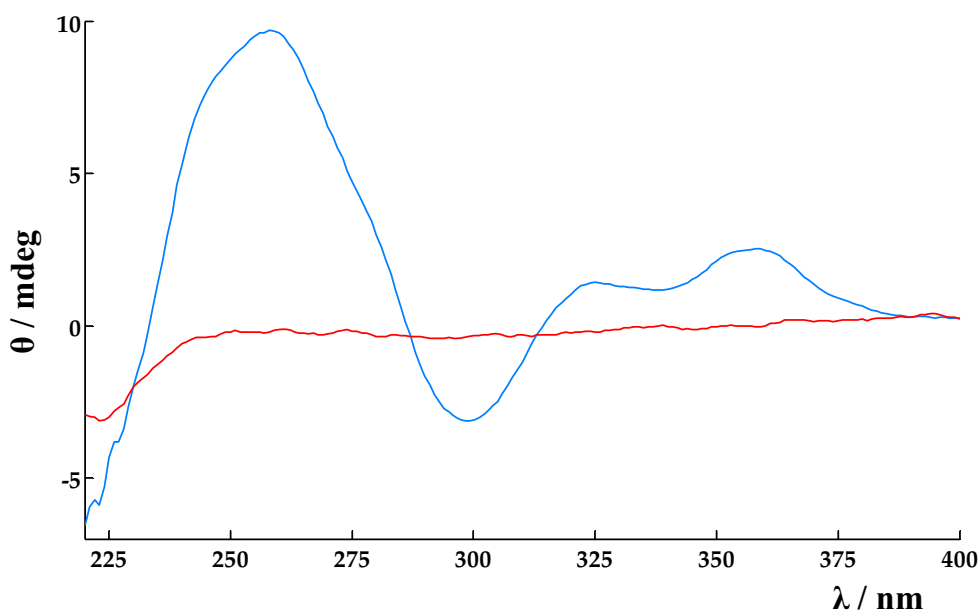


Figura 6. Medidas de dicroísmo circular pertenecientes a una solución de PC_4 en ausencia y presencia de $Pb(II)$. En rojo, el espectro correspondiente a la PC_4 libre; en azul, el espectro correspondiente a un complejo $Pb_2(PC_4)$.

Por último, indicar que la diferencia de absorción entre los dos componentes circularmente polarizados de la luz se expresa generalmente como elipticidad θ (deg), aunque en ocasiones también se utiliza como magnitud la elipticidad molar $[\theta]$ (deg cm² dmol⁻¹).

7

Electrodos de trabajo

7.1. Electrodo de gotas de mercurio

Cuando el físico luxemburgués Gabriel Lippmann estudiaba la relación entre los fenómenos eléctricos y capilares -título de su tesis doctoral- creó el electrómetro capilar de mercurio, un instrumento que podía medir voltajes extremadamente bajos y que se puede considerar el prototipo del electrodo de gotas de mercurio. Unos treinta años más tarde, a principios del siglo XX, el químico checo Bohumil Kucera lo desarrolló para poder medir la tensión superficial del mercurio polarizado; sin embargo, su alumno Jaroslav Heyrovský entrevió muy pronto un nuevo y prometedor método de análisis electroquímico: la polarografía.

Este primer electrodo de mercurio, esquematizado en la figura 1, consiste en un tubo capilar de vidrio unido mediante un tubo de plástico a un depósito de mercurio que se encuentra elevado. Por el tubo capilar fluye continuamente el metal líquido, produciendo en el extremo una minúscula gota prácticamente esférica -expuesta al seno de la disolución problema- que crece hasta que su peso no puede ser soportado por la tensión superficial, formándose entonces una nueva gota. Si se inserta un cable en el reservorio de mercurio y se une al polo negativo de una batería, cada nueva gota constituye un cátodo donde pueden producirse las reacciones redox de las especies químicas.

El electrodo de gotas de mercurio clásico (DME) presenta diversas ventajas respecto a otros electrodos sólidos. Por ejemplo, el tiempo de vida de cada gota normalmente es insuficiente para que las impurezas se adsorban en su superficie o el metal se pasive; además, la caída de cada gota remueve la disolución anulando el efecto de la disminución de las especies electroactivas alrededor de la punta del capilar. Estas características permiten que cada gota sea una interfase de contacto nueva entre el electrodo y la solución.

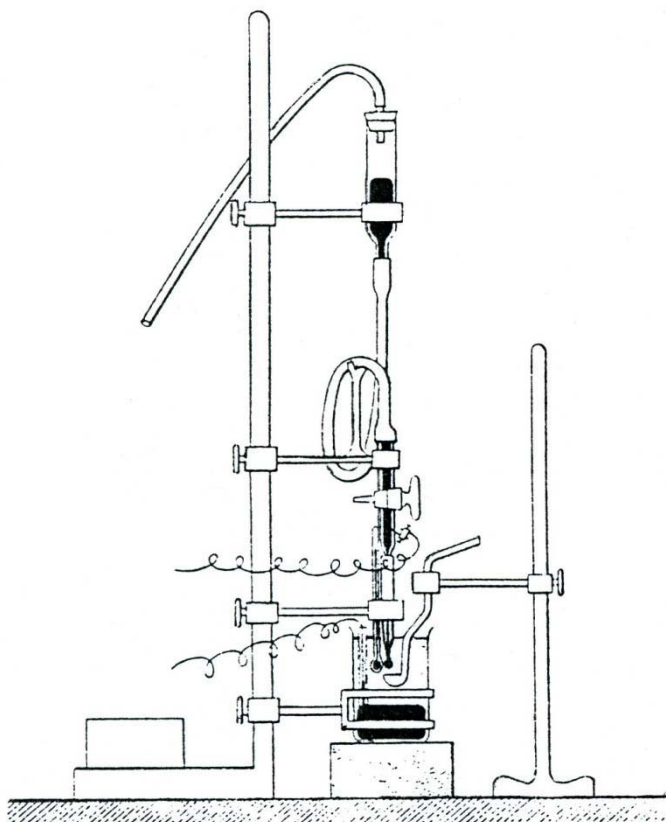


Figura 1. Electrodo de gotas de mercurio como el utilizado por B. Kucera.

Aparte de las ventajas del DME como dispositivo, el mercurio presenta un gran sobrepotencial para la formación del hidrógeno, permitiendo que el intervalo de trabajo catódico sea más extenso de lo predicho por la termodinámica. Esto se debe a que la velocidad de la semireacción $2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$ es muy baja, pues está caracterizada por una constante de reacción heterogénea cuando se da sobre mercurio [4].

Aunque el DME supuso un gran avance en el campo del electroanálisis, también presentaba ciertos inconvenientes que se fueron evidenciando conforme otras técnicas mejoraron sus prestaciones. El principal problema de este electrodo es el cambio constante del área de la gota durante la medida, lo cual complica el tratamiento de la difusión [17] y crea una corriente capacitativa adicional que limita la sensibilidad del análisis. Otro problema, tal vez menor, es que la escala de tiempo experimental está controlada por el tiempo de vida de la gota, generalmente en el rango de 0,5 a 10 s.

Hacia 1980 se empezó a comercializar el electrodo de gotas de mercurio estacionario, un dispositivo automatizado que controla el flujo de mercurio mediante una válvula y que forma gotas en menos de 100 ms con una excelente reproducibilidad y estabilidad. Con este dispositivo, una vez formada la gota, el tamaño no cambia durante la medida y se mantiene hasta desprenderse por acción de un martillo mecánico, con lo que se aseguran todas las ventajas del DME y se añade la de conseguir un área de gota constante, eliminando así la corriente de carga adicional. Actualmente, todos los componentes del electrodo -incluido el depósito de mercurio- forman parte de un dispositivo compacto que se puede utilizar como electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), como electrodo de gotas de mercurio estacionario (SMDE) o como electrodo de gotas de mercurio clásico (DME). En el capítulo 9 se muestra y se explica más extensamente el funcionamiento del electrodo multimodo que se ha empleado en esta tesis.

7.2. Electrodo de película de bismuto

Desde hace unos años se dedica un considerable esfuerzo a investigar materiales alternativos al mercurio para los electrodos de trabajo, materiales no tóxicos pero que generalmente conllevan una disminución del sobrepotencial de hidrógeno -es decir, un intervalo de trabajo menor- y una pérdida de reproducibilidad en las medidas. Algunos ejemplos de estos nuevos electrodos son los electrodos de amalgama sólida (SAE), los electrodos de pasta de carbono modificada (CPE), los electrodos de película de diamante dopado con boro (BDDFE) o los electrodos de *composites* sólidos (SCE) [18-20].

Desde el año 2000, el electrodo de película de bismuto (BiFE) se ha convertido en otra alternativa al mercurio muy atractiva [21], pues este elemento químico tiene una toxicidad baja (se utiliza ampliamente en farmacología) y ofrece un comportamiento electroquímico similar al mercurio [22, 23], sobre todo comparado con otros electrodos como los de película de galio o de antimonio.

La película de bismuto se obtiene introduciendo un sustrato adecuado en una solución de Bi(III) a la cual se aplica un potencial fijo que permite depositar bismuto metálico en su superficie. Dicho sustrato suele ser de carbono (pasta de carbono, fibra de carbono, carbono vitrificado, etc.) aunque también puede servir oro, platino o cobre [24-27]. Existen dos formas de preparar la película. En la deposición *in situ* se introduce el sustrato sobre una disolución que contiene Bi(III) y la especie electroactiva objeto de estudio, reduciéndose ambas simultáneamente; obviamente, este modo de deposición sólo se puede utilizar con técnicas de redisolución. En la deposición *ex situ* el sustrato se introduce en una disolución que sólo contiene bismuto y, una vez formada la película, se realizan las medidas sobre la disolución problema. Los experimentos de esta tesis se han llevado a cabo generando la película de bismuto por deposición *ex situ*, como se detalla más adelante en el capítulo 10.

El aspecto microscópico de la película se ha estudiado por diversas técnicas estructurales como microscopía electrónica de barrido (SEM), microscopía de fuerza atómica (AFM) o espectroscopía de rayos X de estructura fina (EXAFS) [28-30]. En todos los casos se concluye que el bismuto no logra cubrir plenamente el sustrato de carbono pulido, guardando un parecido sorprendente a la estructura en gotitas de la película de mercurio sobre carbono, incluso en el tamaño de los cristales de bismuto.

Los parámetros más importantes en la obtención de la película de bismuto son el potencial de deposición y la concentración de la solución de Bi(III), pues afectan a la calidad, estructura y propiedades de la película de bismuto. A pesar de que no existen unos valores estándar para estos parámetros -en esta tesis, por ejemplo, se optimizan a partir del método original- se sabe que potenciales excesivamente negativos o concentraciones bajas de bismuto producen más puntos de nucleación pero de menor crecimiento cristalino, resultando así una película menos compacta, menos estable y con peor reproducibilidad en las medidas [28, 29]. Esto se debe a que existe una transición

de la fase cristalina semi-metálica a clusters amorfos conforme decrece el tamaño de los cristales de bismuto [31, 32].

El electrodo de bismuto preparado tanto *in situ* como *ex situ* ofrece señales bien definidas, no distorsionadas, y altamente reproducibles; también una excelente resolución de picos contiguos, una buena evolución de la descarga de protones y una relación señal:ruido comparable con la de los electrodos de mercurio. Por tanto, no es de extrañar que el BiFE se utilice cada vez más para el análisis de ultratrazas de metales pesados [23, 33-36], pero también de moléculas orgánicas como medicamentos o herbicidas [37-40] e incluso como electrodo en biosensores [41].

En lo que respecta al análisis de complejos, el electrodo de película de bismuto se utiliza normalmente para determinar metales a los que previamente se añade un agente complejante o complejos naturales como las metalotioneínas [42, 43], pero nuestro grupo de investigación es el primero en utilizar el BiFE en un estudio de especiación metálica, tanto en el último artículo recogido en esta tesis como en alguno posterior [44].

8

Técnicas quimiométricas

8.1. Resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados

Las valoraciones complexométricas realizadas en la presente tesis originan datos multivariantes que pueden organizarse en una matriz cuyas dos direcciones recogen una variación diferente de los datos experimentales. Concretamente, como se puede ver en la figura 1, la dirección del progreso de la valoración recoge la variación en la composición del sistema, mientras que la dirección del barrido de la señal de excitación recoge la variación de la magnitud medida.

Como ya se apuntó en el capítulo 4, una forma de resolver estas matrices es aplicar el método quimiométrico de resolución multivariante de curvas (MCR) que describe las fuentes de la variación como una suma de contribuciones de cada componente puro del sistema [45-49]. Además, esta aproximación no requiere hacer ninguna asunción previa sobre la naturaleza o composición del sistema en estudio para obtener una información que, si bien es un resultado puramente matemático, se la puede dotar de un significado químico.

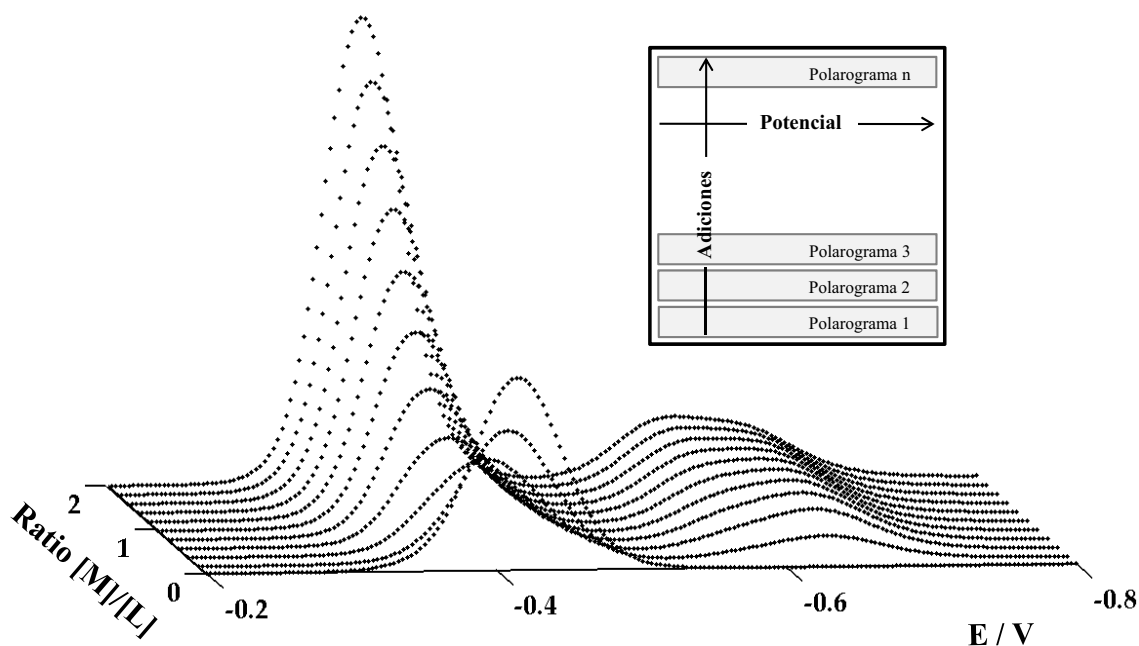


Figura 1. Representación de la matriz de intensidades de una valoración complexométrica registrada por polarografía. La matriz incluye tantas filas como adiciones y tantas columnas como puntos de medida contiene cada polarograma.

El principio básico del MCR es la descomposición matemática de la matriz experimental de datos \mathbf{I} (nF , nC) en un producto de dos matrices abstractas ortogonales \mathbf{C} (nF , nS) y \mathbf{V}^T (nS , nC) para un número preseleccionado de componentes nS . \mathbf{C} y \mathbf{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 \mathbf{I} . Matemáticamente, esta descomposición puede expresarse como:

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

donde \mathbf{X} es la matriz residual que expresa en términos de falta de ajuste la variación no explicada por el producto $\mathbf{C}\mathbf{V}^T$, y \mathbf{T} indica que la matriz \mathbf{V}^T se obtiene de forma traspuesta.

Es importante advertir que, en este contexto, 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 también fenómenos físicos como

la adsorción electródica o la carga de la doble capa [50-52]. Además, una única especie química puede proporcionar más de una respuesta instrumental; por ejemplo, un complejo mixto de dos metales tendría probablemente dos señales voltamperométricas diferenciadas, pero también podría dar dos espectros de dicroísmo diferentes si, en el transcurso de una valoración, cambia su conformación espacial.

El proceso de optimización de las matrices \mathbf{C} y \mathbf{V}^T se puede llevar a cabo mediante métodos no iterativos como Window Factor Analysis (WFA) o mediante métodos iterativos como Iterative Target Transformation Factor Analysis (ITTTFA) o Alternating Least Squares (ALS). En este último método y partiendo de una estimación inicial de \mathbf{C} o \mathbf{V}^T , se optimizan ambas matrices en cada ciclo iterativo sin que ninguna tenga prioridad sobre la otra, terminando este proceso al cumplirse un criterio de convergencia que puede definirse como un valor límite para la matriz \mathbf{X} o como un número máximo de iteraciones [49, 53, 54].

Es precisamente en este proceso ALS donde se introduce toda la información basada en el conocimiento que se tiene de la estructura interna de los datos y de las características químicas del sistema -información en forma de subrutinas implementadas en Matlab que llamamos restricciones-, gracias al cual la estimación inicial evoluciona hacia soluciones con un significado químico, quedando \mathbf{C} como la matriz de la distribución de concentraciones y \mathbf{V}^T como la matriz de vectores respuesta unitarios (voltamperogramas, espectros, etc.) de cada componente. En la siguiente página, figura 2, podemos ver la descomposición de la matriz simulada de la figura 1 al aplicarle MCR-ALS.

Una vez efectuada la factorización, se lleva a cabo 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; estos resultados nos sirven como base para deducir una secuencia de complejación para el sistema estudiado.

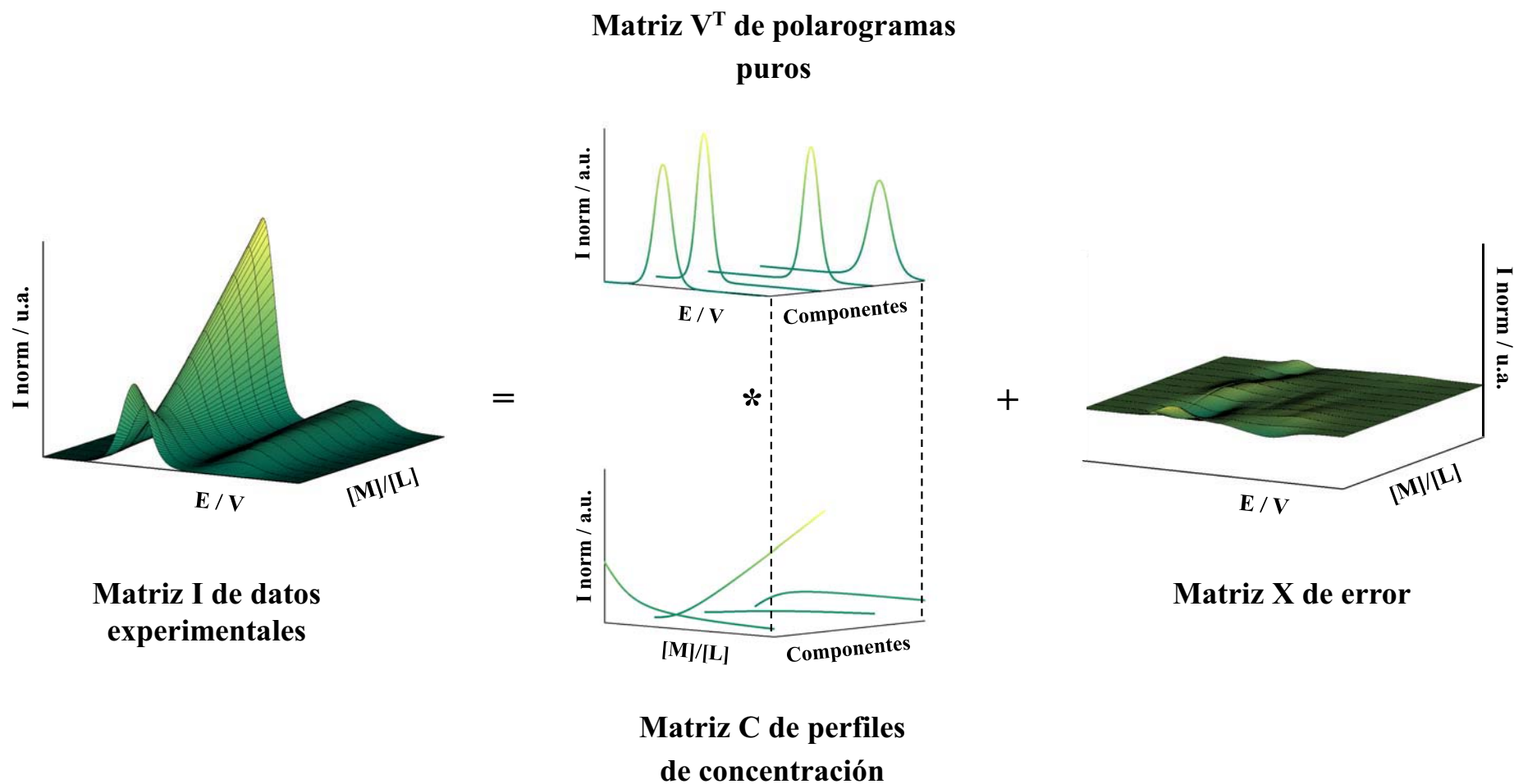


Figura 2. Aplicación de MCR-ALS a la matriz de datos I de la figura 1, obteniéndose las matrices C y V^T para cuatro componentes, así como el error asociado a la operación en la matriz X .

8.2. Modelado blando de las valoraciones complexométricas

El procedimiento de modelado blando para valoraciones complexométricas consta de las siguientes etapas:

- i) Organización matricial de los datos experimentales.
- ii) Suavizado y corrección de la línea base.
- iii) Estimación del número de componentes del sistema.
- iv) Estimación inicial de la matriz \mathbf{C} o \mathbf{V}^T .
- v) Introducción de restricciones y factorización de la matriz experimental \mathbf{I} .

y se lleva a cabo con programas que trabajan en el entorno Matlab, un software versátil y adaptable que permite diseñar nuevas subrutinas o introducir revisiones ante los problemas que puedan surgir durante el análisis.

8.2.1. Creación de la matriz de datos

Una vez registrados los voltamperogramas o espectros a las diferentes proporciones metal:ligando, los datos se transfieren en formato de texto al entorno de Matlab. Mediante el programa *gpes* se estructuran los datos experimentales en un vector de potenciales o longitudes de onda y una matriz de intensidades.

8.2.2. Suavizado de las medidas y corrección de la línea base

Una matriz de intensidades suavizada generalmente conlleva una falta de ajuste menor cuando se descompone durante el proceso iterativo; sin embargo, en ocasiones, esta corrección puede dificultar la diferenciación de componentes si sus vectores respuesta unitarios son excesivamente similares.

El suavizado se lleva a cabo mediante el programa *destral*, corrigiendo primero aquellos puntos que se desvían más de un 5% en la dirección vertical del continuo del escaneado, aunque este parámetro se puede modular. Posteriormente se puede aplicar un filtro de Savitzky-Golay, método de suavizado que ajusta diferentes polinomios a grupos de unos pocos puntos y que tiende a preservar mejor las características iniciales

(tales como máximos y mínimos relativos o el ancho de los picos) que, por ejemplo, la media móvil.

La corrección de la línea base en medidas por difracción circular se realiza sustrayendo el espectro de la disolución amortiguadora al espectro de cada adición, pero en medidas voltamperométricas este punto puede ser uno de los más problemáticos del modelado previo a la aplicación de MCR-ALS.

En este caso, la corrección se realiza 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, con una deriva aceptable e igual durante toda la valoración, la corrección se realiza sobre la matriz **I** entera; en caso contrario, la corrección se ha de realizar voltamperograma a voltamperograma siempre con cuidado de no introducir artefactos en la matriz resultante, pues dificultaría la resolución correcta del análisis quimiométrico.

Si después de la corrección de línea base algún valor de intensidad es ligeramente negativo, su valor se hace cero con el programa *negtozero*.

8.2.3. 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. Estos valores singulares se obtienen mediante el algoritmo Singular Value Decomposition (SVD) que, como su propio nombre indica, descompone la matriz **I** calculando una matriz diagonal cuyos elementos -no negativos y presentados en orden decreciente- son sus valores singulares [55].

La estimación del número de componentes se efectúa visualmente a partir de la representación del vector que contiene los valores singulares (figura 3). Si no existe pérdida de linealidad de los datos electroquímicos, deriva de la línea base u otras interferencias de tipo físico como adsorción electroquímica, los valores singulares más significativos se pueden asociar a especies químicas diferentes o, al menos, a procesos electroquímicos diferentes.

En todo caso, el número de componentes principales estimados no se considera un parámetro fijo; de hecho, es recomendable realizar el análisis por MCR-ALS

considerando diferentes nS , pues así se obtiene un mejor conocimiento del sistema y la dilucidación del modelo de complejación resulta más robusta.

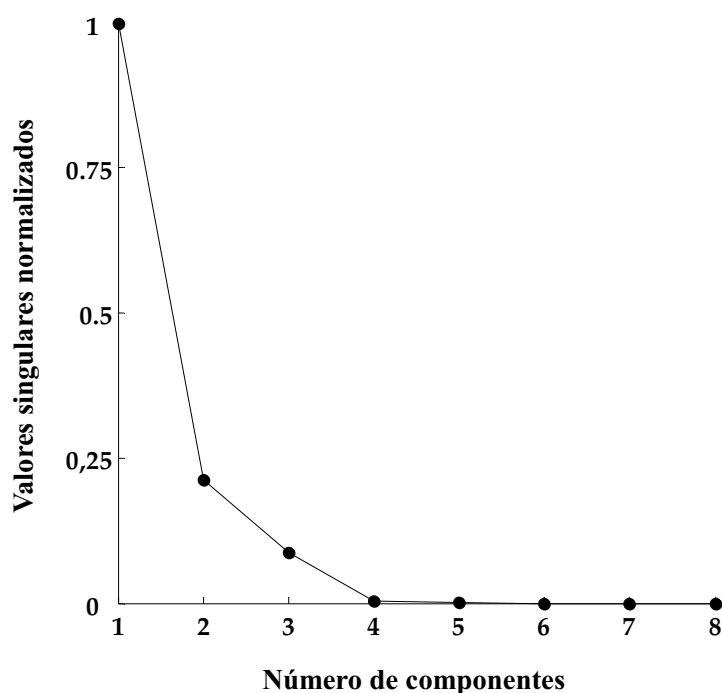


Figura 3. Estimación del número de componentes para la matriz **I** de la figura 1 según sus valores singulares normalizados.

8.2.4. Generación de la estimación inicial

El uso de estimaciones iniciales no aleatorias -es decir, de estimaciones iniciales con significado químico- ayuda a acortar el proceso de optimización y a evitar la convergencia en óptimos locales distantes de la solución deseada.

En medidas voltamperométricas, la construcción de la matriz V_0^T inicial se lleva a cabo mediante un programa desarrollado por el grupo de Electroanálisis llamado *peakmaker* [56]. Este programa permite dibujar en la pantalla del ordenador, para cada uno de los componentes escogidos, un voltamperograma teórico que sigue funciones de tipo gaussiano.

Con respecto a las medidas espectroscópicas, la estimación inicial se realiza mediante el método *simple-to-use interactive self-modeling analysis* (SIMPLISMA) que analiza matemáticamente los datos de la matriz **I** para retornar las columnas con las

variables más puras o las filas con los espectros más puros según lo disímiles que sean unas de otras [57]. En nuestro caso, la construcción de la matriz \mathbf{V}_0^T resulta más intuitiva que \mathbf{C}_0 pues se van seleccionando los barridos más desiguales de forma secuencial, es decir, cada nuevo componente incluido en \mathbf{V}_0^T tendrá el espectro más desigual a todos los seleccionados previamente.

Aunque estos métodos han sido los más utilizados en la realización de la presente tesis, se ha de tener en cuenta que una matriz de estimación inicial puede formarse siempre con filas o columnas de datos que se consideren, por razones químicas, más representativos de cada componente; esto incluye, por ejemplo, información externa como espectros de referencia o perfiles de concentración de otros experimentos ya realizados.

8.2.5. Restricciones

Una restricción puede definirse 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 [58]. Las restricciones se implementan 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 según las condiciones deseadas.

Las restricciones de uso más frecuente en esta tesis son:

- *No negatividad*: Esta restricción 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.
- *Unimodalidad*: La restricción de unimodalidad impone la existencia de un único máximo a cada perfil respuesta. Se aplica a los voltamperogramas para asegurarse de que no contengan hombros o dobles picos de altura superior a un grado de libertad, normalmente un 5% del valor máximo.
- *Crecimiento/decrecimiento monótonico*: Esta restricción se aplica a aquellos componentes cuyos perfiles de concentración sean crecientes o decrecientes

desde su origen hasta el final de la valoración. Para asegurar esta 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.

- *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 [59].
- *Equilibrio químico:* Esta restricción 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.
- *Closure:* La restricción de “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.
- *Selectividad:* A diferencia de las restricciones explicadas hasta ahora, la 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 la fuerza motriz del proceso iterativo hacia la solución correcta y, por tanto, su aplicación debe ser siempre prudente y hacerse con el convencimiento de su validez. De hecho, si se aplican correctamente, las restricciones pueden no causar ningún efecto sobre la fase final del proceso de optimización.

Un ejemplo de matriz aumentada como la representada en la figura 4a sería la formada por una valoración directa (ligando sobre metal) y su inversa (metal sobre ligando) registradas por la misma técnica. En este caso, la respuesta instrumental de cada componente es la misma en I_1 e I_2 , por lo que la variabilidad instrumental al aumentar las columnas de la matriz se mantiene. Como es lógico, las matrices resultantes de la descomposición de I_n serán una matriz V^T única y una matriz C que contiene los perfiles de concentración diferenciados para las dos valoraciones.

La matriz aumentada de la figura 4b se podría formar con la misma valoración estudiada por dos técnicas diferentes como, por ejemplo, polarografía diferencial de impulsos y polarografía de impulsos inversa. En este caso, el progreso de la valoración es el mismo para I_1 e I_2 , por lo que la variabilidad en la composición se mantiene al aumentar las filas de la matriz. Así, las matrices resultantes del proceso iterativo serán una matriz C con unos perfiles únicos para ambas valoraciones y una matriz V^T que contendrá los polarogramas unitarios diferenciados según las dos técnicas utilizadas.

La matriz aumentada de la figura 4c resulta una mezcla de ambos casos, es decir, una valoración determinada y su inversa estudiada por las dos técnicas propuestas, en la cual la variabilidad composicional se mantiene en las filas y la variabilidad instrumental se mantiene en las columnas.

Referencias III

1. J. F. Cassidy, *Compr. Anal. Chem.*, 27 (1992) 1.
2. J. Heyrovský, *Chem. Listy*, 16 (1922) 256.
3. A. M. Bond, *Modern Polarographic Methods in Analytical Chemistry*, Marcel Dekker, New York (1980).
4. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, John Wiley and sons, New York, 2nd ed. (2001).
5. J. Wang, *Analytical electrochemistry*, John Wiley and sons, Hoboken, 3rd ed. (2006).
6. R. G. Compton, C. E. Banks, *Understanding Voltammetry*, World Scientific Publishing., Singapore (2007).
7. J. M. Pingarrón, P. Sánchez, *Química electroanalítica. Fundamentos y aplicaciones*, Síntesis, Madrid (1999).
8. V. G. Singh ed., *Applied Electrochemistry*, Nova Science, New York (2010).
9. J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and applications*, Wiley-VCH, Deerfield Beach (1985).
10. Kh. Brainina, E. Neyman, *Electroanalytical Stripping Methods*, Wiley-Interscience, New York (1993).
11. I. Sestakova, M. Kopanica, L. Havran, E. Palecek, *Electroanalysis*, 12 (2000) 100.
12. N. Serrano, I. Sestakova, J. M. Díaz Cruz, C. Ariño, *J. Electroanal. Chem.*, 591 (2006) 105.
13. D. Jagner, *Trends Anal. Chem.*, 2 (1983) 53.
14. N. Berova, K. Nakanishi, R. W. Woody (eds.), *Circular Dichroism: principles and applications*, Wiley-VCH, New York, 2nd ed. (2000).
15. W. R. Mason, *Magnetic Circular Dichroism Spectroscopy*, John Wiley & Sons, Hoboken (2007).
16. G. D. Fasman, *Circular Dichroism and the Conformational Analysis of Biomolecules*, Springer, New York, 1996.
17. D. Ilkovič, *J. Chim. Phys.*, 35 (1938) 129.
18. B. Yosypchuk, L. Novotny, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 32 (2002) 141.
19. J. Barek, J. Fischer, T. Navrátil, K. Pecková, B. Yosypchuk, J. Zima, *Electroanalysis*, 19 (2007) 2003.

20. T. Navrátil, J. Barek, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 39 (2009) 131.
21. J. Wang, J. Lu, S. Hocevar, P. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 3218.
22. A. Economou, *Trends Anal. Chem.*, 24 (2005) 334.
23. J. Wang, *Electroanalysis*, 17 (2005) 1341.
24. J. Wang, J. Lu, *Electrochem. Commun.*, 2 (2000) 390.
25. S. B. Hocevar, B. Ogorevc, J. Wang, B. Pihlar, *Electroanalysis*, 14 (2002) 112.
26. G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, M. Sofoniou, *Talanta*, 63 (2004) 849.
27. L. M. S. Nunes, R. C. Faria, *Electroanalysis*, 20 (2008) 2259.
28. I. Svancara, L. Baldrianova, M. Vlcek, R. Metelka, K. Vytras, *Electroanalysis*, 17 (2005) 120.
29. A. Krolicka, A. Bobrowski, A. Kowal, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1649.
30. S. I. Cordoba de Torresi, I. A. Carlos, *J. Electroanal. Chem.*, 414 (1996) 11.
31. M. G. Mitch, S. J. Chase, J. Fortner, R. Q. Yu, J. S. Lannin, *Phys. Rev. Lett.*, 67 (1991) 875.
32. H. Ikemoto, T. Miyanaga, T. Kiuchi, *J. Non-Cryst. Solids*, 353 (2007) 3394.
33. S. Legeai, K. Soropogui, M. Cretinon, O. Vittori, A. H. de Oliveira, F. Barbier, M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.*, 383 (2005) 839.
34. S. B. Hocevar, I. Svancara, K. Vytras, B. Ogorevc, *Electrochim. Acta*, 51 (2005) 706.
35. A. Charalambous, A. Economou, *Anal. Chim. Acta*, 547 (2005) 53.
36. S. E. W. Jones, K. E. Toghill, S. H. Zheng, S. Morin, R. G. Compton, *J. Phys. Chem. C.*, 113 (2009) 2846.
37. V. Guzsvany, M. Kadar, F. Gaal, L. Bjelica, K. Toth, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1363.
38. A. S. Arribas, E. Bermejo, M. Chicharro, A. Zapardiel, *Electroanalysis*, 18 (2006) 2331.
39. B. Claux, O. Vittori, *Electroanalysis*, 20 (2008) 291.
40. B. Nigovic, B. Simunic, S. Hocevar, *Electrochim. Acta*, 54 (2009) 5678.
41. S. Timur, U. Anik, *Anal. Chim. Acta*, 598 (2007) 143.
42. M. Yang, Z. Zhang, Z. Hu, J. Li, *Talanta*, 69 (2006) 1162.
43. Y. Fu, M. Xu, X. Li, M. Du, J. Wang, F. Zhou, *Electroanalysis*, 20 (2008) 888.

44. N. Serrano, N. Martín, J. M. Díaz Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis*, 21 (2009) 431.
45. W. H. Lawton, E. A. Sylvestre, *Technometrics*, 13 (1971) 617.
46. E. A. Sylvestre, W. H. Lawton, M. S. Maggio, *Technometrics*, 16 (1974) 353.
47. O. S. Borgen, B. R. Kowalski, *Anal. Chim. Acta*, 174 (1985) 1.
48. O. S. Borgen, N. Davidsen, M. Y. Zhu, O. Oyen, *Mikrochim. Acta*, 2 (1986) 1.
49. A. de Juan, E. Casassas, R. Tauler, in R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory, and Instrumentations*, John Wiley & Sons, New York (2000).
50. J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B. S. Grabarić, M. Esteban, E. Casassas, *J. Electroanal. Chem.*, 393 (1995) 7.
51. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.*, 25 (2006) 86.
52. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, in S. D. Brown, R. Tauler and B. Walczak (eds.), *Comprehensive Chemometrics vol. 4, Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier Science, Oxford (2009).
53. R. Tauler, A. K. Smilde, B. R. Kowalski, *J. Chemom.*, 9 (1995) 31.
54. R. Tauler, *Chemom. Intell. Lab. Sys.*, 30 (1995) 133.
55. E. R. Malinowski, *Factor Analysis in Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 3rd ed. (2002).
56. M. J. López, C. Ariño, S. Díaz-Cruz, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 5609.
57. W. Windig, J. Guilment, *Anal. Chem.*, 63 (1991) 1425.
58. A. de Juan, Y. Vander Heyden, R. Tauler, D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, 346 (1997) 307.
59. J. Mendieta, M. S. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 134.

Parte IV

EXPERIMENTAL

9

Instrumentación y reactivos

9.1. Instrumentación

Los estudios voltamperométricos de especiación se han realizado utilizando diferentes tipos de electrodos que se muestran en la figura 1. Respecto a los dos electrodos de trabajo empleados, el primero es un dispositivo de uso muy extendido que combina el modo gotas de mercurio estáticas (SMDE) con el modo gotas de mercurio colgantes (HMDE). El mercurio, que se reutiliza tras bidestilarlo, fluye desde el cuerpo del electrodo hasta un capilar de vidrio no silanizado en cuya punta se forma una gota de superficie constante. Aunque en la presente tesis se ha utilizado eventualmente el modo HMDE, las diferentes valoraciones se han realizado en el modo SMDE. El otro electrodo de trabajo utilizado es el electrodo de carbono vitrificado sobre el que se deposita electroquímicamente una fina capa de bismuto (BiFE-GC).

La celda electroquímica consta, además, del electrodo auxiliar (una varilla de carbono vitrificado, inerte) y del electrodo de referencia ($\text{Ag}|\text{AgCl}|\text{KCl } 3 \text{ mol L}^{-1}$) que están en contacto con el mismo electrolito de fondo que la solución problema de la celda.

Las medidas polarográficas realizadas con el electrodo de mercurio se han llevado a cabo con un equipo 757 VA Computrace de la empresa Methrom conectado a un ordenador personal mediante el software de adquisición de datos “VA Computrace 1.0”. Las medidas voltamperométricas y cronopotenciométricas realizadas con el electrodo de

película de bismuto se han realizado con un equipo Autolab System PGSTAT12 de la firma Eco Chemie conectados a un stand polarográfico 663 VA de Methrom y a un ordenador personal mediante el software de adquisición de datos “GPES 4 4.9”.

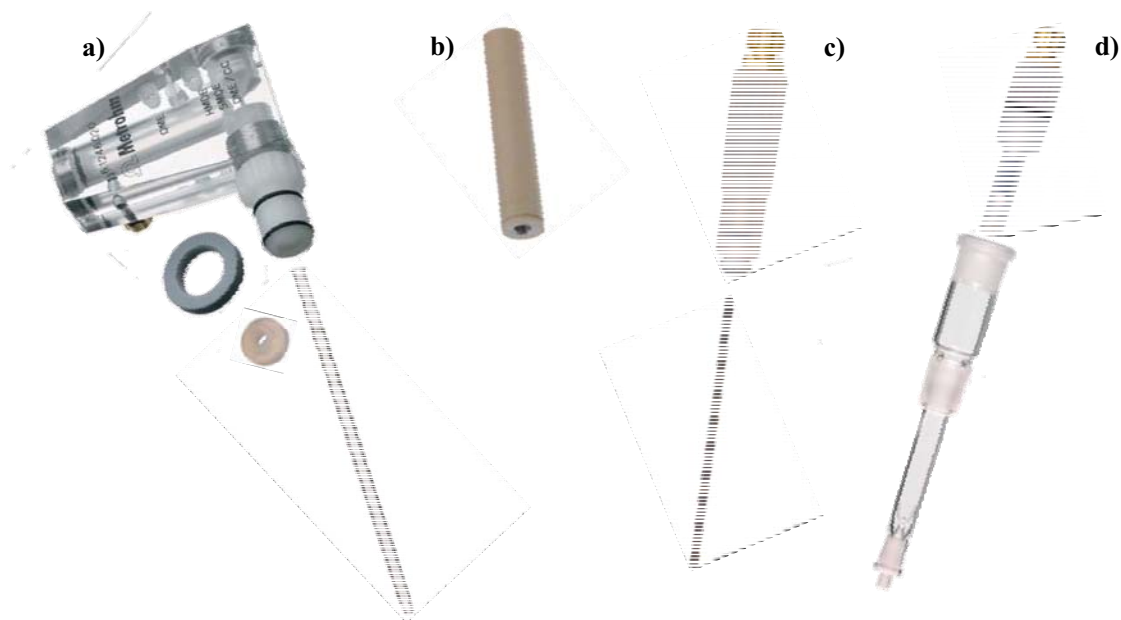


Figura 1. Tipos de electrodos utilizados. **(a)** Electrodo multimodo de gotas de mercurio y capilar de vidrio; **(b)** electrodo de disco sólido con punta de carbono vitrificado; **(c)** electrodo auxiliar de carbono vitrificado; **(d)** electrodo de referencia Ag|AgCl y puente salino para el electrolito.

Como se ve en la figura 2, el montaje experimental se completa con una celda electroquímica que contiene los tres electrodos y la disolución de iones metálicos y/o ligandos, un electrodo combinado Orion 9103SC conectado a un pH-metro Thermo Orion 4 star para controlar el pH, y un flujo de nitrógeno que se pasa antes de iniciar la valoración y después de cada adición. Este flujo de nitrógeno evita la oxidación de los compuestos y la aparición de señales propias del oxígeno. Durante las valoraciones, las adiciones se realizaron manualmente con micropipetas automáticas Nichipet EX (Nichiryo).

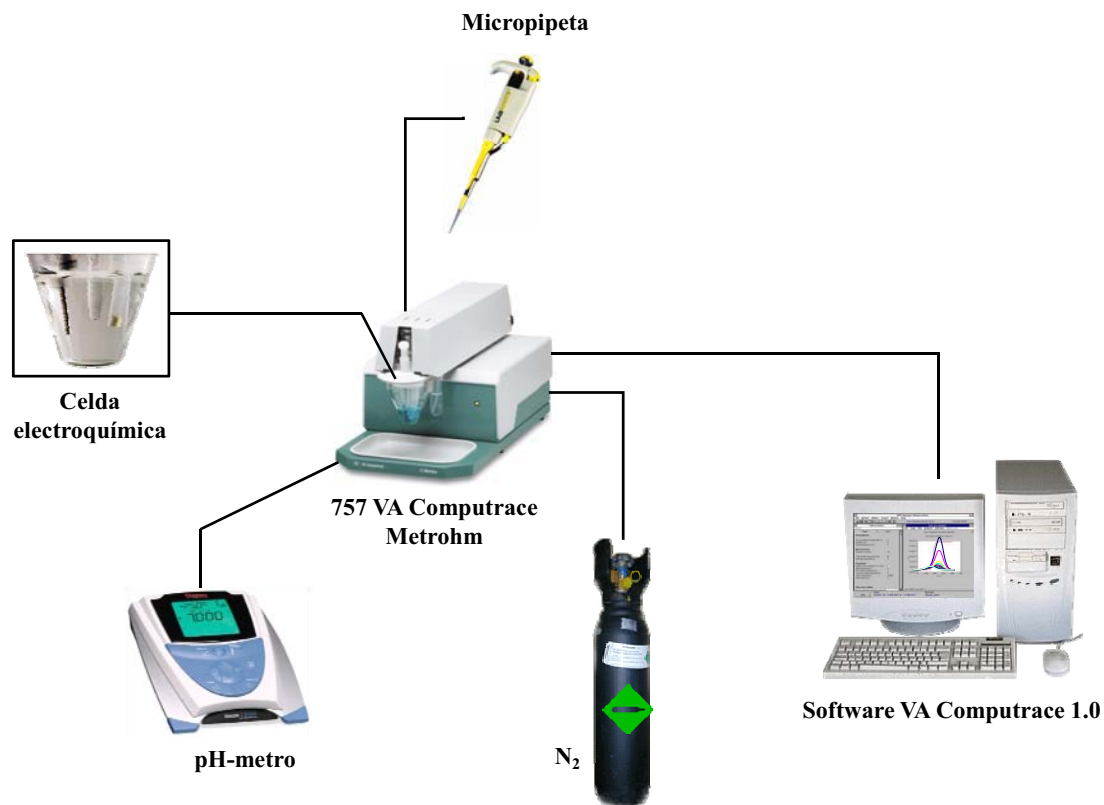


Figura 2. Esquema del montaje experimental utilizado en las valoraciones polarográficas.

Las medidas de dicroísmo circular se han obtenido utilizando un espectropolarímetro Jasco J-810 (fig. 3) equipado con una lámpara de arco de xenón de 450 W y controlado por un ordenador personal mediante el software de adquisición de datos *Spectra manager*. La cámara donde se realizan las medidas se purgó con una corriente de nitrógeno de 5 L min^{-1} , caudal típico para medidas que no alcanzan el ultravioleta lejano ($\lambda < 200 \text{ nm}$).

La celda de absorción, cilíndrica, de la empresa Hellma, tiene ventanas de cristal de cuarzo. Se han utilizado de diversos caminos ópticos, siendo el de 10 mm el más común.



Figura 3. Fotografía del espectropolarímetro Jasco J-810 y, en la esquina superior derecha, la celda cilíndrica de absorción.

9.2. Reactivos y disoluciones

Todos los reactivos utilizados son de grado analítico o suprapuro y proceden de las empresas Merck, Sigma-Aldrich, Fluka o Panreac.

Los fragmentos del glutatión (Cys-Gly y γ -Glu-Cys) y el aminoácido Glicina (Gly) han sido suministrados por Sigma-Aldrich, mientras que el glutatión en su forma reducida (GSH) ha sido suministrado por Merck, todos ellos con una pureza superior al 99%. Las fitoquelatinas (γ -Glu-Cys)₂-Gly (PC₂), (γ -Glu-Cys)₃-Gly (PC₃) y (γ -Glu-Cys)₄-Gly (PC₄) han sido sintetizadas por la empresa DiverDrugs, S.L. como trifluoroacetatos, con una pureza cromatográfica superior al 90% en todos los casos. Las impurezas son fragmentos minoritarios de PC sin los grupos tiol reducidos, por lo que su impacto en el proceso de complejación es mínimo.

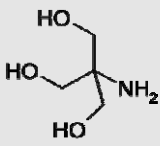
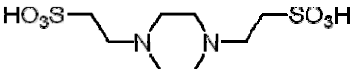
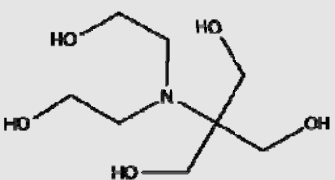
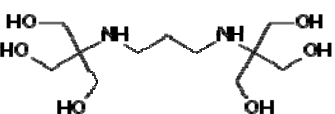
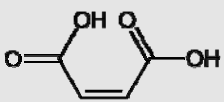
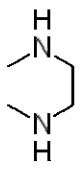
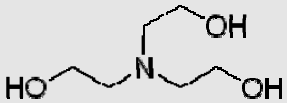
Todas las disoluciones utilizadas en la presente tesis se han preparado a partir de los reactivos recogidos en la tabla 1 y utilizando agua ultrapura obtenida del equipo de purificación Milli-Q plus 185, de la marca Millipore.

Tabla 1: Reactivos de las disoluciones auxiliares utilizadas.

Nombre	Fórmula	Marca
Nitrato de cadmio	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Nitrato de plomo	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Merck
Nitrato de zinc	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Nitrato de potasio	KNO_3	Fluka
Hidróxido de potasio	KOH	Merck
Ácido nítrico	HNO_3 al 65%	Merck
Ácido clorhídrico	HCl al 30%	Merck
Cloruro de potasio	KCl	Fluka
Etanol absoluto	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	Sigma-Aldrich
Sal disódica del EDTA	$\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Panreac
Patrón Bi(III) 996 $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bi en 5% de HNO_3	Sigma-Aldrich
Ácido acético	CH_3COOH al 100%	Merck
Acetato de amonio	$\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$	Merck
Dihidrogenofosfato de potasio	KH_2PO_4	Merck

Las valoraciones se han realizado utilizando diferentes disoluciones amortiguadoras de pH, que se han preparado a partir de sustancias cuyas estructuras se recogen en la tabla 2.

Tabla 2: Reactivos de las disoluciones amortiguadoras utilizadas.

Nombre	Fórmula	Marca
Tris-(hidroximetil)-aminometano, TRIS		Sigma-Aldrich
Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico, PIPES		Sigma-Aldrich
Bis(2-hidroxietil)-amino-tris (hidroximetil)-metano, Bis-TRIS		Sigma-Aldrich
1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamin) propano, Bis-TRIS propano		Sigma-Aldrich
Ácido (Z)-butendioico, ácido maleico		Fluka
1,4-diazociclohexano, piperazina		Sigma-Aldrich
Tris(2-hidroxietil)amina, trietanolamina		Sigma-Aldrich

10

Procedimientos experimentales

10.1. Valoraciones por voltamperometría diferencial de impulsos

Se prepara una disolución amortiguadora de concentración 0,02-0,05 mol L⁻¹ que además sea 0,05 mol L⁻¹ en KNO₃ (0,01 mol L⁻¹ si se combina con otro experimento registrado por dicroísmo) y que contenga también una concentración 10⁻⁵ mol L⁻¹ en metal (valoración directa) o 2x10⁻⁵ mol L⁻¹ en ligando (valoración inversa). Se vierten 20 mL de esta disolución en la celda electroquímica y se desoxigena durante 30 minutos pasando una corriente de nitrógeno por la disolución. Se registran tres voltamperogramas a fin de comprobar la reproducibilidad de la señal, y se guarda el último de ellos en el disco duro del ordenador, tanto en el formato propio del software como en .txt o .ascii, para poder abrirlos posteriormente en el entorno de Matlab.

Entonces se realiza la valoración, añadiendo progresivamente el volumen requerido de metal o ligando según el número de ratios [M]/[L] que se pretenda obtener. Después de cada adición, se registra y graba el voltamperograma y se desoxigena la disolución en la celda durante 45 s aproximadamente, a fin de asegurar la ausencia de oxígeno.

10.2. Preparación del electrodo BiFE-CG

La obtención de una película de bismuto homogénea requiere la preparación previa de la superficie del electrodo sólido sobre el cual se deposita el metal; en nuestro caso, esta

superficie es una barra de carbono vitrificado con un diámetro de 2 mm ensamblado en un cilindro de teflón.

10.2.1. Pulido del carbono vitrificado

La rugosidad y otras alteraciones en la microestructura de la superficie del carbono vitrificado afectan a la formación ulterior de la película de bismuto y, por tanto, a las reacciones electroquímicas que se den en el electrodo de trabajo. Existen diversos métodos para eliminar el material adsorbido y para asegurar una superficie completamente lisa del carbono vitrificado, habiendo elegido nosotros el pulido mecánico. El proceso de pulido se ha de realizar antes de la formación de cada nueva película de bismuto.

Los elementos utilizados para el pulido mecánico forman un kit (fig. 1a) que consta de diferentes superficies de pulido, soportes de vidrio y recipientes con suspensiones de agentes abrasivos -diamante y alúmina- de diferentes tamaños de partícula.

Las etapas del pulido del carbono vitrificado se recogen en la figura 1b:

1. Se pega una superficie de Texmet[®] sobre el soporte de vidrio para tener una superficie de pulido lisa sobre la que retener el agente abrasivo.
2. Se limpia la superficie del electrodo con agua destilada y etanol para eliminar el material adherido y se seca con papel suave.
3. Se humedece la superficie de pulido con agua destilada y se añaden unas gotas de suspensión abrasiva, en nuestro caso alúmina, comenzando siempre por la de mayor tamaño de partícula.
4. Se pule el electrodo moviéndolo sobre la superficie de pulido en forma de ocho, siempre en el mismo sentido. Es conveniente cambiar el punto de presión sobre el electrodo para obtener un pulido uniforme.
5. Tras unos minutos se limpia el electrodo con agua y etanol para eliminar las partículas abrasivas.

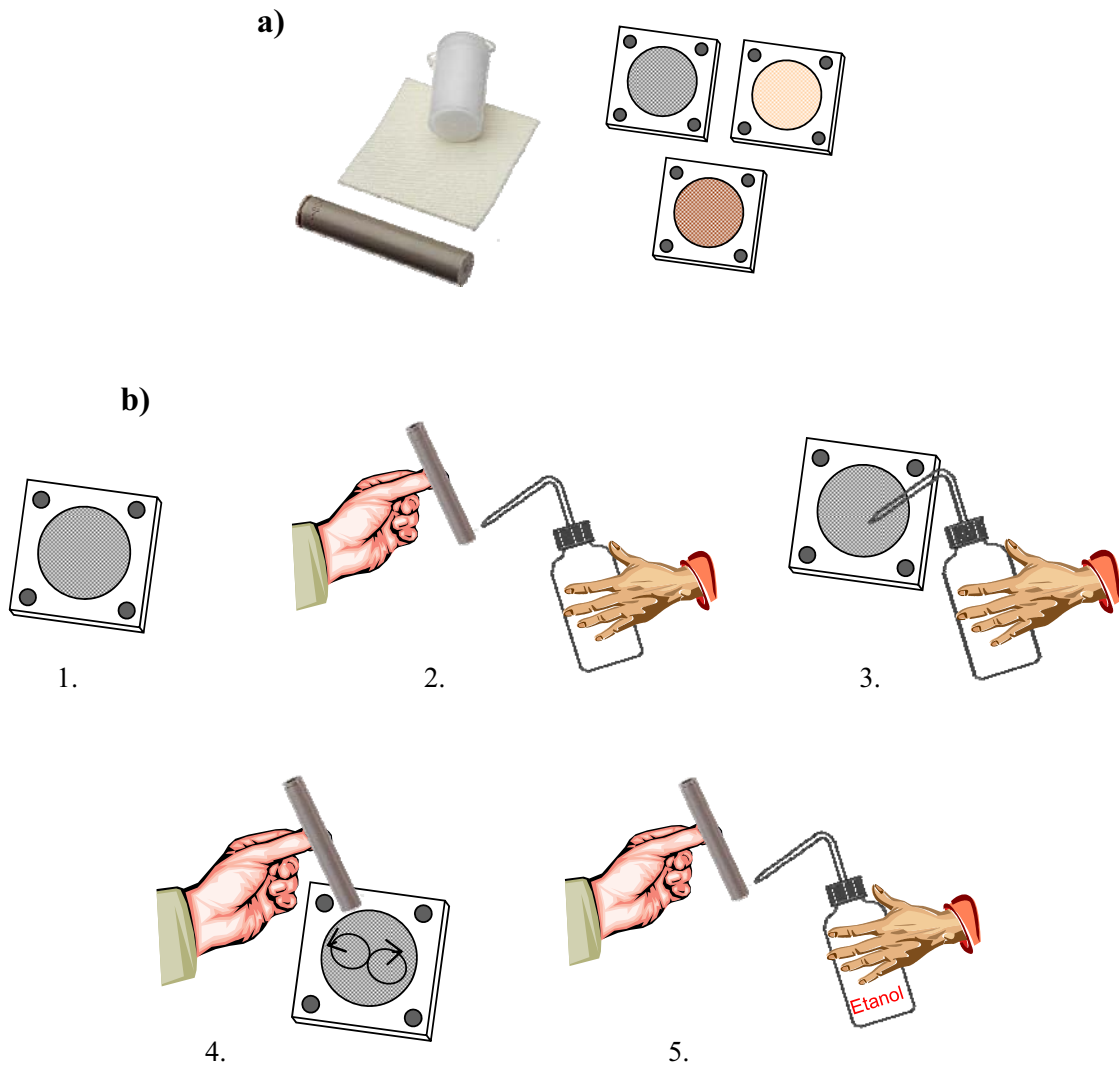


Figura 1. Proceso de preparación del electrodo sólido. (a) Juego de pulido; (b) etapas del pulido mecánico.

Una vez completado el pulido, el electrodo se sumerge en agua destilada durante unos minutos dentro del baño de ultrasonidos, para asegurar así la total eliminación de cualquier partícula de alúmina.

10.2.2. Obtención de la película de bismuto

El procedimiento de deposición *ex situ* utilizado es una modificación parcial del que se adopta de forma general, modificación realizada tras optimizar los valores de potencial y tiempo de deposición, entre otros parámetros. El proceso comienza sumergiendo los

electrodos de carbono, de referencia y auxiliar en una disolución amortiguadora $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ de acético/acetato de pH 4,5 que contiene, además, 100 ppm de Bi(III). Tras desoxigenar la disolución, se aplica un potencial de deposición de $-0,6 \text{ V}$ durante 5 minutos, haciendo girar el electrodo de carbono vitrificado a 500 rpm. A continuación, ya sin rotación, se esperan 20 segundos y se limpian los tres electrodos con agua destilada. Por último, se reemplaza la solución de Bi(III) por la solución problema.

Sin necesidad de un tratamiento electroquímico posterior, se obtienen películas de bismuto con una alta repetitividad (R.S.D. = 2,5%) y buena reproducibilidad (R.S.D. = 10,2%), así como un amplio intervalo de potencial de trabajo (fig. 2) que permite estudiar la complejación de compuestos tóxicos con Pb(II). El electrodo BiFE-CG así obtenido se puede utilizar, como máximo, durante un día entero.

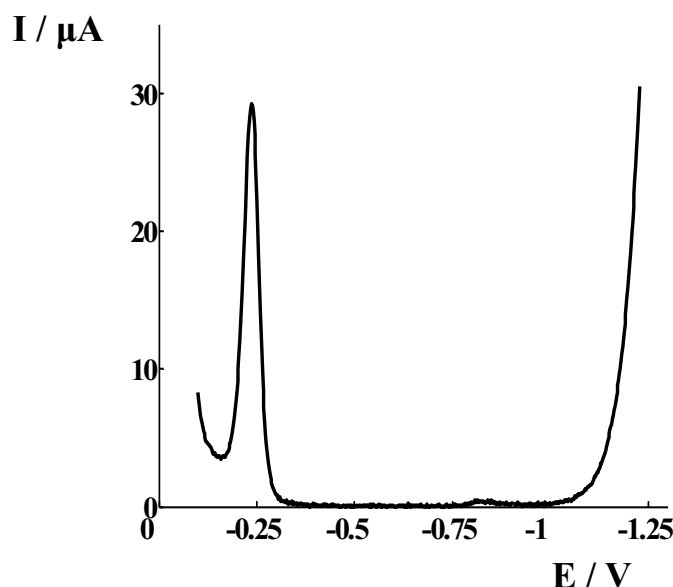


Figura 2. Voltamperograma de una disolución $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 medido con un electrodo BiFE-GC.

10.3. Valoraciones por dicróismo circular

Las valoraciones realizadas por dicróismo circular se diseñaron para hacer un estudio quimiométrico combinado con las valoraciones realizadas mediante polarografía diferencial de impulsos. Lo deseable era, por tanto, que las condiciones experimentales para ambos tipos de valoración fueran las mismas, a fin de asegurarse una idéntica

evolución de las especies químicas. Sin embargo, esto no pudo conseguirse enteramente, pues algunas sustancias o concentraciones utilizadas en las valoraciones polarográficas producen la saturación de las medidas de dicroísmo circular; y viceversa, las concentraciones necesarias en dicroísmo producen fenómenos de adsorción electrodo e incluso la propia saturación del electrodo de mercurio.

10.3.1. Optimización de las sustancias y sus concentraciones

Las diferentes sustancias utilizadas como electrolito de fondo en las valoraciones polarográficas presentan sus máximos de absorción en el UV lejano. Por tanto, en las valoraciones espectroscópicas, la absorbancia crece conforme el barrido se acerca a longitudes de onda menores, llegando a un valor (λ_{lim}) en el cual no se puede medir correctamente la elipticidad, fenómeno conocido como saturación por absorbancia.

Como ya se explicó anteriormente, el espectropolarímetro emite una radiación polarizada circularmente que atraviesa la muestra, recogiendo el detector la fracción de luz no absorbida. Cuando el valor de la absorbancia es demasiado alto y no llega suficiente luz al detector, se fuerza un incremento del flujo lumínico de la lámpara de xenón que genera ozono corrosivo para los espejos, produce la fotólisis de la muestra y aumenta tanto el ruido en la señal que resulta inútil medir la elipticidad.

Por otra parte y como también se ha explicado ya, el espectro de los ligandos libres empiezan a $\lambda < 250$ nm y continúan con una forma excesivamente simple y poco definida, a diferencia de los complejos. Un ejemplo de este hecho se muestra en la figura 3, donde se representan dos espectros de dicroísmo sin tratar: en azul el espectro de la PC_3 pura y en rojo la última adición de su valoración con cadmio, esto es, una mezcla de complejos PC_3 -Cd; en la parte inferior se muestran las medidas de absorbancia, considerándose poco fiables medidas de elipticidad con un valor de absorbancia superior a 2,5 y totalmente erróneas si éste llega a 3. Por tanto, la matriz experimental resulta válida, en este caso, hasta $\lambda_{lim} \approx 230$ nm, valor en el cual la información aportada por la PC_3 es escasa. Este es el principal problema al que nos enfrentamos al hacer valoraciones por dicroísmo, que los espectros de las fitoquelatinas, glutatión o sus fragmentos presentan una escasa información diferencial que aportar al tratamiento quimiométrico combinado posterior.

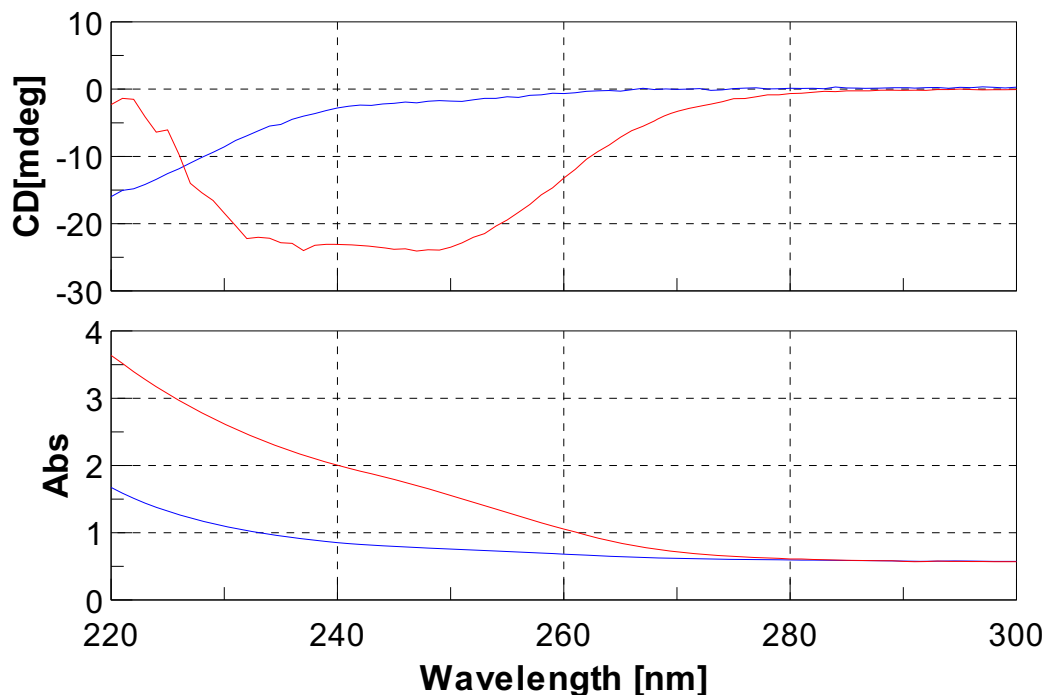


Figura 3. Medidas de elipticidad (arriba) y absorbancia (abajo) pertenecientes a una solución $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PC₃ valorada con Cd(II) en solución amortiguadora de PIPES. En azul, el espectro correspondiente a la PC₃ libre; en rojo, el espectro correspondiente a una ratio $[\text{Cd}^{2+}]/[\text{PC}_3] = 4,0$.

Con el objetivo de llegar a una λ_{lim} lo más pequeña posible, esto es, de tener la máxima información sobre el “componente” ligando libre, se probó como afectaban al nivel de saturación las diferentes sustancias presentes en las valoraciones polarográficas y sus concentraciones. El KNO₃ utilizado como electrolito soporte se descartó desde el principio, pues su λ_{lim} a concentración $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ es 270 nm y, de todas formas, su presencia no es necesaria para las valoraciones por CD ni su efecto sobre la evolución de las especies parece apreciable. Respecto a los ligandos, utilizamos la concentración inicial mínima que permite la diferenciación entre su espectro y el de la primera adición de la valoración. Esta concentración es mayor conforme más corta es la cadena polipeptídica, como se recoge en la tabla 3.

Tabla 3: Concentración mínima necesaria de ligando utilizada en las valoraciones con Pb(II).

Ligando	Cys-Gly	γ -Glu-Cys	GSH	PC ₂	PC ₃	PC ₄
C/mol L ⁻¹	1×10^{-4}	1×10^{-4}	8×10^{-5}	5×10^{-5}	2×10^{-5}	$< 1 \times 10^{-5}$

Como se puede ver, para las valoraciones de PC₃ y PC₄ se pudo utilizar la misma concentración inicial que en las valoraciones por DPP, pero no para la PC₂, el glutatión o sus fragmentos. Ciertamente, en estos casos podríamos haber incrementado sensiblemente la concentración inicial de ligando en las valoraciones polarográficas, pero preferimos no hacerlo por no alejarnos de la concentración del medio celular, esto es, de los estudios *in vivo* o *in vitro*. Además, la adsorción de estas especies sobre el electrodo cuando las concentraciones son elevadas resulta tan importante que puede causar graves problemas en la medida electroquímica e incluso la obturación del capilar del SMDE.

En lo referente a las disoluciones amortiguadoras, las valoraciones con cadmio no supusieron problema, pues compuestos como el TRIS o el PIPES son relativamente transparentes en dicróismo. Aún así, se disminuyó en lo posible la concentración de las disoluciones amortiguadoras para obtener un λ_{lim} menor, verificando siempre que los cambios de pH durante la valoración fueran mínimos. Encontrar una disolución amortiguadora para las valoraciones con Pb(II) representó un problema mayor, pues este catión precipita con carbonatos, arseniatos, carboxilatos, la mayoría de las formas del azufre, etcétera. Tampoco se pudo utilizar un tampón de mono/dihidrogenofosfato -uno de los más utilizados en técnicas espectroscópicas- pues aunque el plomo no precipita, forma algún tipo de complejo electroinactivo, es decir, no se obtiene señal de plomo libre en las valoraciones polarográficas.

Se realizaron entonces más pruebas con sustancias que no presentan grupos funcionales susceptibles de precipitar con el plomo y cuyas disoluciones tienen el rango de pH adecuado, como el Bis-TRIS propano, la piperazina, la trietanolamina, etcétera, siendo el Bis-TRIS el que menor λ_{lim} ofreció. Sin embargo, aunque el catión Pb²⁺ libre no precipitó con estos tampones, sí lo hacían los complejos formados con el glutatión o sus fragmentos.

En cualquier caso, la utilización de cubetas de camino óptico más corto hubiera hecho disminuir el valor de λ_{lim} , pero también nos hubiera obligado a incrementar la concentración mínima de metal o ligando para obtener la misma intensidad de señal, con el consecuente aumento global de la saturación de las medidas.

10.3.2. Procedimiento experimental

Las medidas de dicroísmo circular se realizaron en los Servicios Científico-Técnicos (UB) donde no existe una salida de nitrógeno que asegure una atmósfera inerte durante la valoración. Se hicieron entonces diversas pruebas en las que se comprobó que los grupos tiol se oxidan en contacto con la atmósfera impidiendo su complejación, hecho agravado por la lentitud de las valoraciones por dicroísmo.

Dado que las medidas se realizan dentro de un receptáculo del espectropolarímetro en el que constantemente pasa un caudal de nitrógeno, se optó por utilizar la celda de absorción como si de una celda electroquímica de menor volumen se tratara, es decir, como una celda fija.

Así pues, se preparan dos disoluciones amortiguadoras que contengan, respectivamente, el ligando y el metal con las concentraciones necesarias. Se desoxigenan en el laboratorio de Electroanálisis durante 1 h pasando una corriente de nitrógeno. Una vez en los Servicios Científico-Técnicos se vierte el volumen necesario de la disolución a valorar dentro de la cubeta de cuarzo (2,2 mL para un camino óptico de 10 mm, el caso más usual), se tapa y se introduce en el espectropolarímetro. Se registran dos o tres espectros para comprobar la reproducibilidad de la señal, y se guarda el último de ellos en el formato propio del software y como .txt, a fin de abrirlos posteriormente en el entorno de Matlab.

Entonces, se añade el volumen requerido de la disolución valorante sin retirar la cubeta del receptáculo de medida, esto es, mientras la corriente de nitrógeno mantiene una atmósfera inerte. Una vez tapada la celda de absorción, se lleva al exterior y se agita manualmente durante unos segundos para volver a introducirla en el espectropolarímetro y registrar el correspondiente espectro.

Con este procedimiento experimental, en el que todos los volúmenes se miden con pipetas automáticas, no se advirtió ningún problema de oxidación de los ligandos libres o complejados.

Parte V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

11

Presentación de resultados

Las investigaciones llevadas a cabo sobre la complejación de fitoquelatinas con plomo utilizando técnicas voltamperométricas y quimiométricas han permitido la publicación de seis artículos, trabajos que creemos lo suficientemente relacionados como para disponerlos en un capítulo único, aunque ésta es sólo una cuestión formal. En un primer artículo (11.1), se pone de manifiesto los problemas surgidos al aplicar MCR-ALS a datos voltamperométricos en sistemas PC/Pb(II); en los tres siguientes se proponen nuevas herramientas o metodologías para intentar solucionar dichos problemas, artículos más teóricos aunque también se aplican a sistemas sencillos con Cd(II) o Zn(II); finalmente, se aplican estas metodologías a sistemas con Pb(II).

Las herramientas o metodologías presentadas no son afines entre sí, aunque se pueden aplicar a un mismo sistema en estudio. Sin entrar en detalle, avanzamos aquí que la primera de ellas (11.2 y 11.5) es el análisis MCR-ALS de matrices espectro-electroquímicas obtenidas de un mismo sistema; la segunda (11.3 y 11.5) es un programa integrado en Matlab que permite corregir el desplazamiento de potencial de las señales voltamperométricas como paso previo a la aplicación de MCR-ALS; por último (11.4 y 11.6), se utiliza un electrodo de película de bismuto en vez del más habitual electrodo de gotas de mercurio. Esta es la primera vez que se utilizan las dos primeras herramientas citadas, y en cuanto al uso del electrodo de película de bismuto, bastante extendido actualmente, es la primera vez que se aplica a un estudio de complejación.

Las herramientas propuestas sirven para obtener los resultados presentados en los diferentes artículos, pero esperamos que en el futuro puedan aplicarse también a otros experimentos más ambiciosos como los estudios de competencia entre diferentes metales o entre diferentes ligandos, estudios que se prevén más dificultosos debido a la multiplicidad de señales pero cuyas conclusiones serían también más valiosas. En el caso de la politoxicidad -una situación habitual en los ecosistemas contaminados-, se intenta explicar la competición de los metales por los diferentes sitios de interacción molecular, responsables en último término de la diferente proporción de PC sintetizadas; en el segundo caso, la competición entre ligandos sucesivos (Cys-Gly y GSH; GSH y PC₂, etcétera), puede ayudar a esclarecer los mecanismos de formación y desintoxicación de las fitoquelatinas.

11.1 Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-Phytochelatin systems

A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Talanta 71 (2007) 344-352

La metodología básica utilizada por el grupo de Electroanálisis para estudiar la complejación de Cd(II) y Zn(II) con fitoquelatinas se basa en el análisis mediante MCR-ALS de los datos obtenidos de valoraciones que se siguen por diferentes técnicas voltamperométricas. Con esta metodología -a veces complementada con otras técnicas- se han conseguido valiosos resultados, ya sea la determinación de constantes de estabilidad o de la secuencias de formación de los diferentes complejos. El único estudio llevado a cabo con plomo, el sistema GSH/Pb(II) [1], puso de relieve algunos problemas como el fuerte solapamiento entre las distintas señales y la falta de linealidad de los datos polarográficos.

En el presente artículo se estudia la complejación del Pb(II) tanto por los fragmentos del glutatión (γ -Glu-Cys y Cys-Gly) como por la PC₂ y PC₃, mostrándose la eficacia del análisis MCR-ALS de datos polarográficos incluso en condiciones desfavorables, así como sus limitaciones cuando éstas son excesivamente importantes.

Soft modelling for the resolution of highly overlapped voltammetric peaks: application to some Pb-phytochelatin systems

Arístides Alberich, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

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

Received 19 December 2005; received in revised form 31 March 2006; accepted 6 April 2006

Available online 26 May 2006

Abstract

A differential pulse polarographic (DPP) study of the $\text{Pb}^{2+}/\text{Cys-Gly}$, $\text{Pb}^{2+}/\gamma\text{-Glu-Cys}$, $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_2$ and $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_3$ systems is performed, being PC_2 and PC_3 the phytochelatins of general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, with $n = 2$ and 3 , respectively. Analysis of DPP data is assisted by multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) method in order to establish the complexes formation sequence and their final stoichiometries. DPP signals of these systems present, besides overlapping of peaks due to free metal ion and metal complexes, interference of mercury anodic signals. Despite these complications, MCR-ALS allows us to propose a model of complexation for each system, and some tentative structures for the complexes.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Heavy metals speciation; Lead; Phytochelatins; Voltammetry; Multivariate curve resolution

1. Introduction

Heavy metals can cause serious damages – even at very low doses – by replacing essential elements on biological functions. This makes indispensable the heavy metal detoxification of contaminated soils in order to avoid their entry in the trofic chain. Among the methods to remove/immobilize metals, bioremediation (the process of using organisms to restore damaged areas) presents the advantages of being cheap and non-destructive to ecological systems [1].

In response to an excessive uptake of certain heavy metal ions, plants, algae and many fungi can induce the intracellular synthesis of Cys-rich polypeptides [2,3]. These peptides, named phytochelatins (PC_n), have the general structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, where n can be as high as 11, but is generally in the range of 2–5. In the case of mammals, heavy metal regulation is through metallothioneins (MT) that are also proteins with high content in thiol groups.

The synthesis of PC_n in plants and algae has been widely demonstrated both in laboratory cultures and in field studies, and the recent advances in the understanding of PC_n biosynthesis and

its function are derived predominantly from molecular genetic approaches using model organisms [3–6]. However, sequence of formation and final stoichiometry of PC_n -metal complexes is still not totally known. By this reason, it is of great interest to study these complexation processes to understand and optimize phyto remediation.

Voltammetric techniques have proved to be useful for the study of heavy metal complexation by MT [7,8] and PC_n [9,10] because they allow working at the cellular concentration and because the strong dependence of voltammetric signals on the metal speciation. In fact, differential pulse polarography (DPP) provides signals for the different species of the system: free peptide, free metal ion and metal bound in different chemical environments. The application of multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) to DPP data allows the characterization of involved systems taking profit of its great capability to resolve highly overlapped signals [11–13]. Such approach has been satisfactorily applied in the study of Cd- PC_2 and Cd/Zn- PC_3 systems [14,15], of Cd/Zn with α - and β -MT domain [16] and of Zn-glutathione-fragment systems [17].

In the present paper, the complexation of PC_2 , PC_3 and two glutathione-fragments with Pb^{2+} has been considered. Although Scarano and Morelli [9] induced PC_n formation in algae and studied their metal complexes (including lead) by DPP or by combination of size-exclusion chromatography with off-line

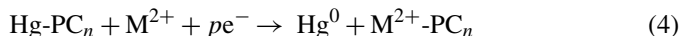
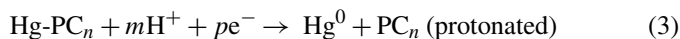
* Corresponding author. Tel.: +34 93 402 15 45; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: cristina@apolo.ubi.ub.es (C. Ariño).

detection of PC by HPLC, and metal ion by atomic absorption spectrometry [18], to the best of our knowledge, Pb^{2+} has been not systematically studied in the presence of PC_n until now.

In a previous work [19], the complexation of Pb^{2+} by glutathione was investigated, obtaining satisfactory results but remarking the experimental and data treatment difficulties due to the interference of the anodic signals of mercury. These signals come from the formation of mercurous thiolate of the pure ligands. Thus, for instance, a cysteine mercurous thiolate $\text{Hg}_2(\text{SR})_2$ is formed when the potential previous to the DPP pulse is sufficiently positive to produce mercury oxidation [20], what is favored by the presence of a complexing medium:



In a similar way, other mercury thiolates [21–23] can be formed and then, when a reducing potential pulse is applied, two kinds of processes can take place:



coming out the free ligand and the complex signal that are related to the anodic processes. The potentials of these anodic signals depend on the Hg-ligand bond and on the ligand equilibria, but they appear in the Pb^{2+} reduction region, thus yielding overlapping signals and hindering the resolution of the systems. Then, from a methodological point of view the resolution of these systems has great interest as examples of particularly complicated cases.

2. Experimental

2.1. Chemicals and instrumentations

Cys-Gly and γ -Glu-Cys were provided by Sigma with a purity of 85% PC_2 and PC_3 by Diver Drugs with a purity of 91.8 and 91.4%, respectively. All other reagents used were Merck analytical grade. Pb^{2+} stock solutions were prepared by dissolving $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ in water and standardized complexometrically [24]. 0.01 mol L^{-1} maleic acid/maleate buffer solutions were used for pH regulation and ionic strength control. Maleate forms weak and labile Pb^{2+} -complexes [25] that can be easily considered as side reactions using the formalism of conditional stability constants. All solutions were prepared in ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185, Millipore).

Differential pulse polarography (DPP) measurements were performed in an Autolab system PGSTAT20 (EcoChemie, The Netherlands) attached to a Metrohm 663 VA stand (Metrohm, Switzerland) and a PC with GPES4 software (EcoChemie). An Orion SA 720 pH-meter was used for pH-monitoring during the experiments. All measurements were carried out in a glass cell at room temperature (20 °C) under a purified nitrogen atmosphere (SEO N50). Working, reference and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE, drop area of 0.5 mm²), an $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ reference electrode and a glassy carbon

electrode, respectively. Pulse time of 50 ms, pulse amplitude of 50 mV, drop time of 0.8 s and potential step of 4 mV were used.

2.2. Procedure

In titrations of peptide with Pb^{2+} , 20 mL of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ peptide solution in maleic/maleate buffer (pH 6.8) are placed into the cell and purged with nitrogen during 40 min. Then, a DPP curve is recorded. After that, aliquots of a $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Pb^{2+} solution are added and DPP curves recorded. Between additions, solutions are purged and mechanically stirred for 1.5 min. Titrations are also performed in the opposite way: 20 mL of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb^{2+} solution are placed into the cell and, after deaeration and measurement, aliquots of $2.5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ peptide are done, and the corresponding DPP curves recorded.

3. Data treatment

Voltammograms are smoothed, baseline-corrected, and converted into data matrices by means of some homemade programs implemented in Matlab [26]. When a non-negligible volume of titrant solution is added, data are also corrected for dilution. Multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) analysis of data is done by several homemade Matlab programs available at: <http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>.

The main object of MCR-ALS and its different steps have been described elsewhere [11–16,27]. However, it is important to remark for further discussions that in the frame of MCR-ALS application to electrochemical data, the concept of “component” must not be interpreted as a chemical species, as it happens with spectroscopic data, but to an electrochemical process giving a signal (including physical phenomena like, for instance, electroic adsorption of a species [14]).

Relevant constrains used here in MCR-ALS treatment are: selectivity, non-negativity and signal shape (to describe the expected peak-shaped signal by a proper parametric equation [12]). The chemical equilibrium constrains for successive, mononuclear and electroactive complexes is also considered in some cases in the present work. This approach consists of fitting a set of complexation constants $\beta_1 \cdot \dots \cdot \beta_n$ to the concentration profiles obtained at every ALS iteration. This requires the assumption of a complexation model, i.e., the number and stoichiometry of metal complexes and some initial estimates of the stability constants [28]. The constrain is based on the combination of mass balances and equilibrium constants to yield the polynomial equation:

$$\begin{aligned} &[\text{L}]^{n+1} \beta_n + [\text{L}]^n \{\beta_n (n c_{\text{TM}} - c_{\text{TL}}) + \beta_{n-1}\} \\ &+ [\text{L}]^{n-1} \{\beta_{n-1} ((n-1) c_{\text{TM}} - c_{\text{TL}}) + \beta_{n-2}\} \\ &+ \dots - c_{\text{TL}} = 0 \end{aligned} \quad (5)$$

where $\beta_0 = 1$ and c_{TM} and c_{TL} are the total concentrations of metal and ligand, respectively. Using the command *roots* of Matlab it is possible to find a numerical solution for the free ligand concentration $[\text{L}]$, which, for a set of c_{TM} and c_{TL} values,

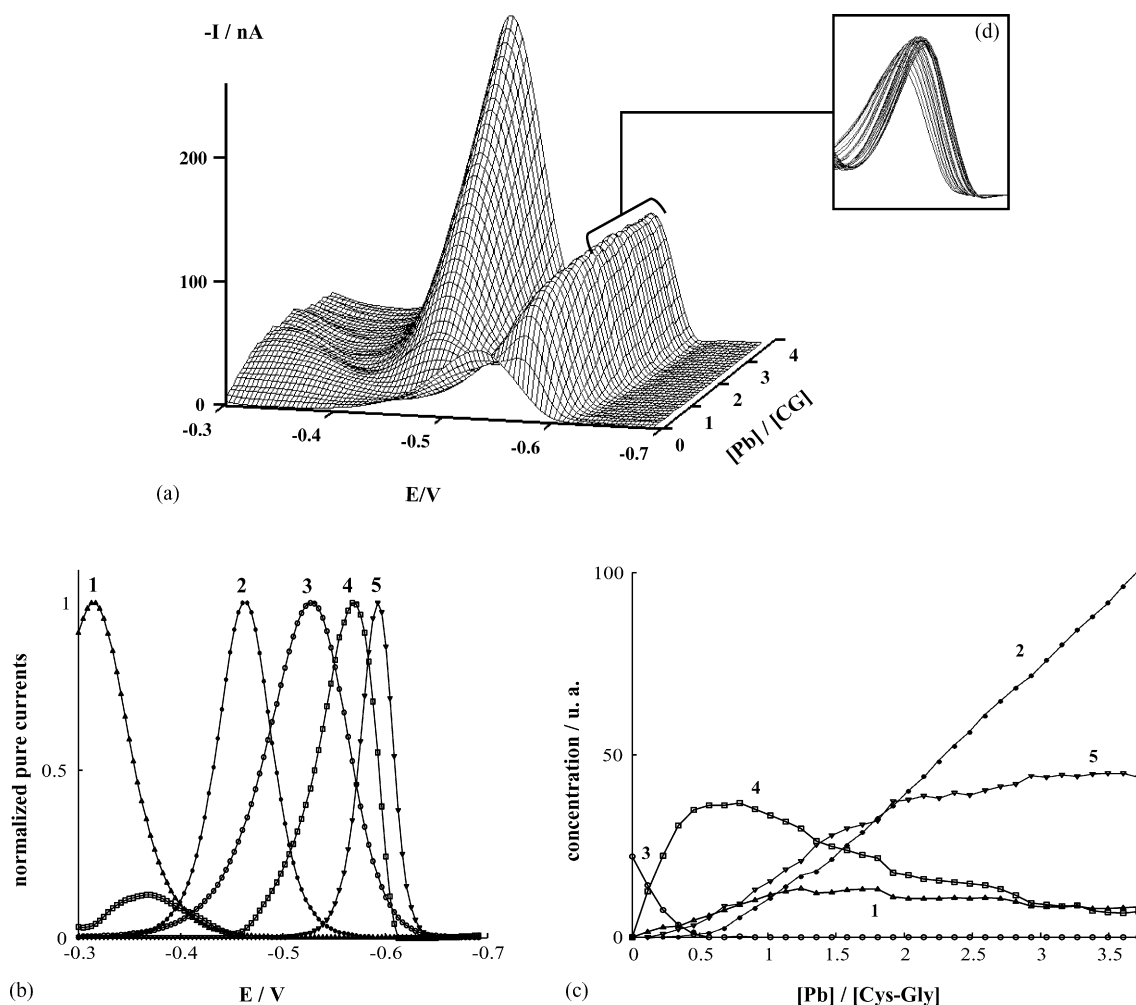


Fig. 1. Current data matrix obtained in the DPP titration of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cys-Gly with Pb^{2+} at pH 6.8 (a), the corresponding normalized unitary voltammograms (b) and concentration profiles (c) obtained in the MCR-ALS analysis of the data, and detail of a part of the matrix (d).

allows one to obtain the equilibrium concentration of all metal species from $\beta_1 \cdots \beta_n$ (*betacalc* program) and vice versa (*betafit* program).

Once the ALS decomposition has been performed, the resulting matrices must be analyzed: matrix \mathbf{V}^T gives normalized individual voltammograms for each component (process), while matrix \mathbf{C} gives their concentration profiles. When the equilibrium constrain is applied, besides the optimized \mathbf{C} and \mathbf{V}^T matrices, an optimized set of complexation constants is obtained. The analysis of this information allows us to obtain the possible stoichiometries (provided by the metal–ligand ratios where species appear, disappear or stabilize), some suggestions about the relative stability of metal bindings and, as a consequence, of the complexes (the more negative is the peak potential, the more stable are the bindings of the complex), and, in some cases, some indications about reversibility or presence of adsorption phenomena. The relative error of \mathbf{I} matrix decomposition is expressed as a percentage of lack of fit (lof).

In the following the components described from MCR-ALS analysis are numbered according to their situation on the potential axis.

4. Results and discussion

4.1. Pb^{2+} /Cys-Gly system

Fig. 1a shows the evolution of the DPP curves recorded in the titration of Cys-Gly with Pb^{2+} . Singular value decomposition (SVD) of the data matrix suggests the existence of at least four components (results not shown). However SVD does not provide conclusive information but guidance for further steps in MCR-ALS since different electrochemical processes behaving in a similar way could be not resolved by SVD and thus considered as a single component [12]. This can be the present case, where the reduction processes of Pb^{2+} -complexes are associated to several anodic processes due to Hg electrode (see further). As discussed later, the application of constrains in MCR-ALS (especially signal-shape), allows one to resolve some of these ambiguities.

The best MCR-ALS results (lof=5.7%) were obtained assuming five components, and applying constrains of non-negativity for both concentrations and signals, selectivity at the beginning of the titration and signal-shape for the voltammo-

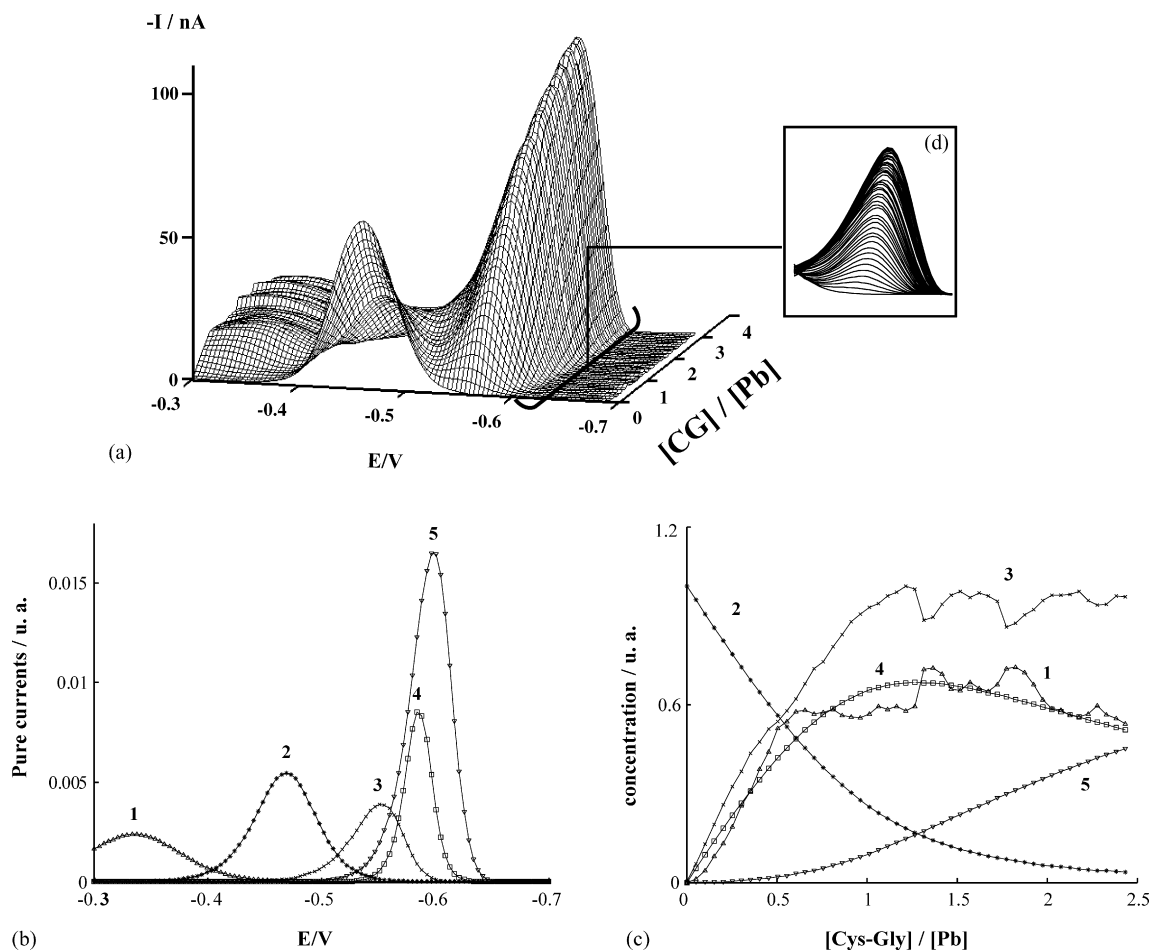


Fig. 2. Current data matrix obtained in the DPP titration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ with Cys-Gly at pH 6.8 (a), the corresponding unitary voltammograms (b) and concentration profiles (c) obtained in the MCR-ALS analysis of the data, and detail of a part of the matrix (d).

grams of all components except component 4 because, as it can be observed, component 4 shows a peak at ca. -0.60 V and a second minor peak at ca. -0.35 V . In Fig. 1b, component 2 is clearly associated to the reduction of free Pb^{2+} , whereas component 3 represents the electrode process of Cys-Gly, i.e., the reduction of the Hg-Cys-Gly complexes formed on the Hg electrode surface, as observed previously [17]. The rest of components are related to the reduction of Pb^{2+} bound to Cys-Gly in different ways.

From concentration profiles in Fig. 1c, it can be deduced that component 4 is related to the reduction of a 1:2 Pb^{2+} :Cys-Gly complex since it reaches a maximum at a ratio close to 0.5, then stabilizes and at ratios greater than 1 begins to decrease. Component 1 shows a qualitatively analogous behavior to component 4; this feature, added to the fact that its peak potential is pH-independent (experiments not shown) and less negative than the reduction potential of free Pb^{2+} , suggests that component 1 is related to anodic Hg processes where the Pb complexes are involved [17]. Such processes can be very intricate and sometimes cannot be explained with a single component. In the present case, most of the evolution of the signal is explained with component 1 and it seems that the lower peak of component 4 explains the additional variations of the anodic signal that are produced as the 1:2 Pb^{2+} :Cys-Gly complex is formed. It must be noted that the use of two components to explain the anodic signal

produced poorer results than the ones here described. The previous assignments of components 2 and 3 to free Pb^{2+} and Cys-Gly, respectively, are consistent with the stoichiometry proposed for the complex (component 4) because Cys-Gly disappears at the Pb^{2+} :Cys-Gly ratio of 0.5 and then free Pb^{2+} appears. The proposal of a fifth component has been necessary to justify the shift of the signal at more negative potentials once it reaches a maximum of intensity (Fig. 1d), and to achieve satisfactory results. This kind of potential shift means a serious problem in the MCR-ALS analysis of voltammetric data because it can be caused by some phenomena (equilibria among different species, loss of reversibility, presence of electrodic adsorption) that generate a loss of linearity on the measured current. The achievement of linearity (required by MCR-ALS) is reflected in voltammetry by a fix potential peak for each electrochemical process. The overall evolution of the concentration profiles of components 4 and 5 is not conclusive and the reverse titration must be considered.

In the titration of Pb^{2+} with Cys-Gly (Fig. 2), a first MCR-ALS analysis shows two components (numbers 4 and 5) related to two different complexes, two components associated to anodic Hg processes (components 1 and 3) and the component due to the reduction of free Pb^{2+} (component 2). The hypothesis of formation of two complexes (probably with 1:1 and 1:2 Pb^{2+} :Cys-Gly stoichiometries) is held by the picture of the zone where the

Table 1
Tentative structures for the proposed complexes of the studied Pb^{2+} -peptide systems

System	Complexes	Models
Pb-Cys-Gly	ML	
	ML ₂	
Pb-PC2	ML	
	M2L	
Pb-PC3	ML	
	M2L	

Black balls correspond to thiol groups and grey balls to Pb(II).

complexes appear (Fig. 2d), showing the progressive shift of the peak towards more negative potentials since the beginning of the titration, just the opposite to the previous titration. In order to verify this hypothesis, the equilibrium constrain was applied to components 2, 4 and 5 (related to free Pb^{2+} , 1:1 and 1:2 complexes, respectively) in a new MCR-ALS analysis of the data matrix from the titration of Pb^{2+} with Cys-Gly. The fitting was quite satisfactory (lof = 9.7%) providing the stability constant values of $\log \beta_1 = 6.10 \pm 0.02$ and $\log \beta_2 = 11.19 \pm 0.03$ for the 1:1 and 1:2 complexes, respectively, and both the unitary voltammograms and concentration profiles (Fig. 2). In Fig. 2c it can be seen that the components 2, 4 and 5, related to the species involved in the equilibrium constraint, present smoothed concentration profiles, in the same way as the unit voltammograms constrained to signal shape, whereas the concentration profiles not restricted to the equilibrium constraint (components 1 and 3) accumulate more noise than in previous cases (e.g. Fig. 1c). The goodness of these results confirms the formation of two successive complexes with the tentative structures proposed in Table 1.

4.2. Pb^{2+}/γ -Glu-Cys system

The data matrices obtained in the DPP titrations of γ -Glu-Cys with Pb^{2+} and vice versa are qualitatively comparable to those of

the Pb^{2+} -Cys-Gly system (Figs. 1a and 2a, respectively), but with the signals due to the anodic Hg processes more strongly overlapped to the signals associated to the reduction of both free and complexed Pb^{2+} . After several analyses of these data by MCR-ALS, satisfactory results and conclusions were not achieved. However, it seems that, as in the previous system, a 1:2 complex predominates in the titration with Pb^{2+} (results not shown). No useful information can be drawn from the titration with peptide.

4.3. Pb^{2+}/PC_3 system

Because of some additional complications on the Pb^{2+}/PC_2 system as respect to Pb^{2+}/PC_3 , systematic study of Pb^{2+}/PC_3 is firstly described.

The SVD analysis from the data matrix of the titration of PC_3 with Pb^{2+} (Fig. 3a) suggests the existence of five components. In MCR-ALS analysis, constrains of non-negativity for both concentrations and signals, selectivity for PC_3 at the beginning of the titration and for all those species whose concentrations become zero along the titration and, finally, signal shape for the voltammograms of all species out of component 5 are applied. The reasons for not applying signal shape constrain to component 5 are essentially the same as in the case of component 4 in Pb/Cys-Gly system. Figs. 3b and c summarize the most satisfactory MCR-ALS results achieved (lof = 7.4%).

Component 4 is clearly associated with PC_3 because it is the only that appears before the addition of Pb^{2+} . The electrochemical process behind this signal is probably the reduction of the Hg- PC_3 complex formed due to the previous oxidation of Hg in the presence of PC_3 , as it happens with many sulfur compounds [23]. Free PC_3 disappears at a Pb^{2+} -to- PC_3 ratio close to 1.0. This value is determined from the projection of the initial profile of component 4.

Component 2 is undoubtedly due to the reduction of the free Pb^{2+} because of its location (Fig. 3b). Moreover, at ratios higher than 2, the added Pb^{2+} remains free and its concentration increases linearly (Fig. 3c).

Components 3 and 5 seem to correspond to the reduction of Pb^{2+} bound to PC_3 in different manners. An explanation of the complexation sequence could be as follows: when Pb^{2+} is added to PC_3 , and until a Pb^{2+} -to- PC_3 ratio of 1.0, a very stable 1:1 complex, with Pb^{2+} very strongly bound to two thiols of the same PC_3 molecule, is formed (related to component 5). As more Pb^{2+} is added, the concentration of this 1:1 complex remains constant but another two components appear until Pb^{2+} -to- PC_3 ratios slightly higher than 2. Component 3 seems to be related to the reduction of other Pb^{2+} bound at quite less negative potential than the other. Thus, the final compound is a 2:1 $Pb^{2+}:PC_3$ complex, and component 3 may be the reduction of the Pb^{2+} bound to the sulfur atom that remains free in PC_3 after the binding of the first Pb^{2+} . This description takes into account the evolution of concentration profiles, and the Pb^{2+} -to- PC_3 ratios where components appear, disappear or stabilize. Table 1 shows the proposed tentative structures of these complexes.

As mentioned previously for peptidic fragments, and due to the location of its normalized unitary voltammogram (Fig. 3b),

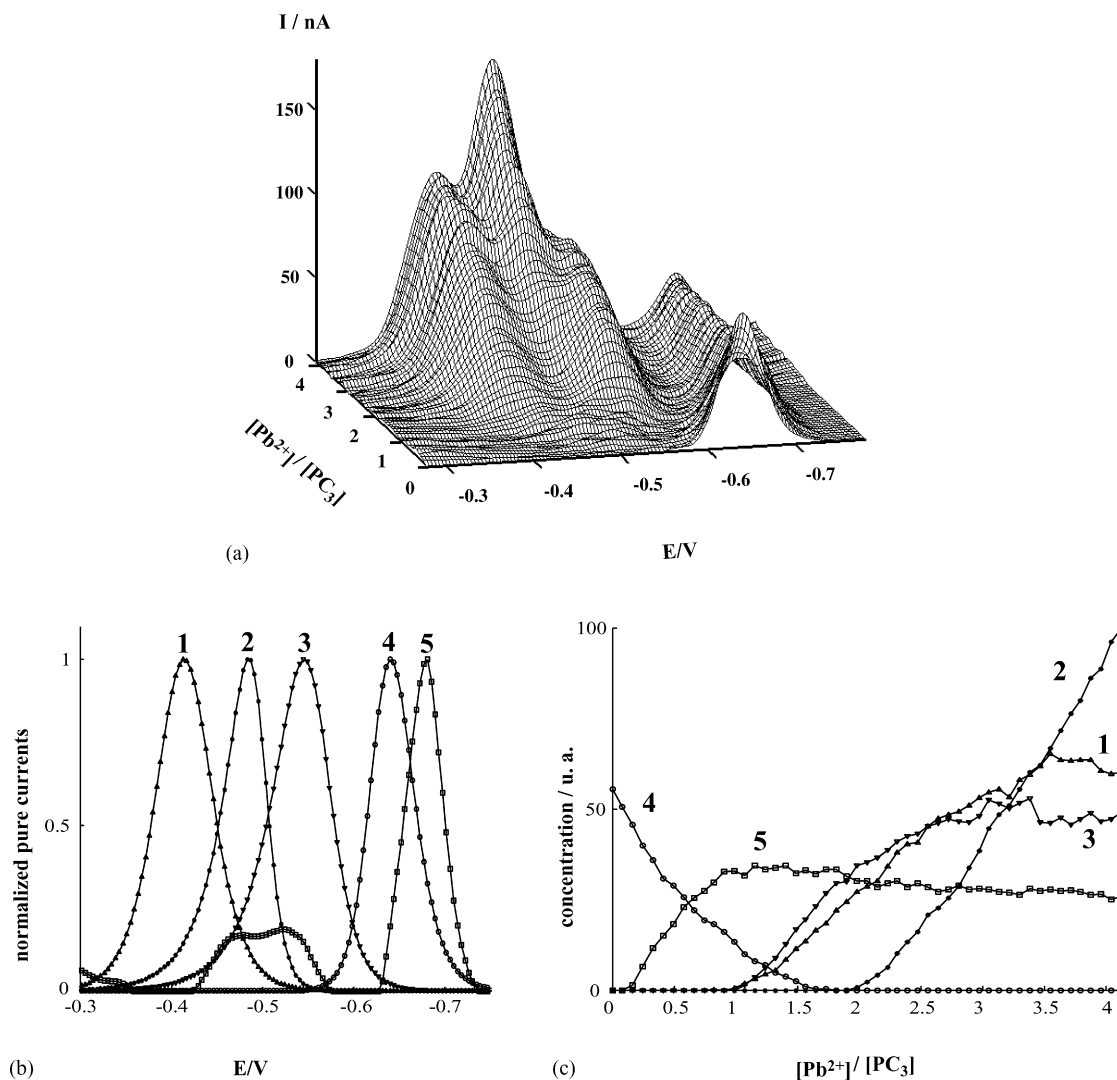


Fig. 3. Current data matrix obtained in the DPP titration of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{Gly}$ (PC_3) with Pb^{2+} at pH 6.8 (a), and the corresponding normalized unitary voltammograms (b) and concentration profiles (c) obtained in the MCR-ALS analysis of the data.

component 1 may be the anodic signal associated to component 3 because they evolve in parallel (Fig. 3c).

Stabilisation of components 3 and 1 occurs at ratios higher than 2 (Fig. 3c). This is probably due to the adsorption of the complex onto Hg electrode, increasing the signal currents, and consequently, the concentrations profiles.

Concerning the titration of Pb^{2+} with PC_3 (Fig. 4a), the large background of the data matrix associated to anodic processes is the predominant feature. SVD cannot yield reliable results due to the deficiency of rank of the data, i.e., the number of components that may be linearly interdependent in their contributions to the total current is high. Thus, components 1 and 2 are related to the anodic processes associated with the appearance of free PC_3 (component 4) and of a complex (component 5), respectively. Finally, component 3 corresponds to the reduction of free Pb^{2+} . Despite the species distribution (Fig. 4c), when MCR-ALS is applied without the signal shape constrain (Fig. 4b), the normalized unitary voltammogram of the complex includes two minor anodic signals. Although this profusion of anodic signals means a limitation in the estimation of stoichiometries, from concen-

trations profiles diagram (Fig. 4c) a 1:1 complex seems to be formed. The greatest ambiguity is in the stoichiometry of the complex because of the almost total overlapping with the signal due to free PC_3 (component 4). It appears from that diagram that the M_2L complex is not formed, as we expected, even at the beginning of the titration, when the excess of free Pb^{2+} is high. This fact probably responds to the preference of Pb^{2+} to be strongly bound by two sulfur groups of the same PC_3 . In spite of all these considerations, the error associated to the MCR-ALS decomposition is considerably low (lof = 5.3%).

4.4. $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_2$ system

The comparison of matrices for the $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_3$ system with these of PC_2 shows similar evolutions. So, in MCR-ALS analysis of data from the titration of PC_2 with Pb^{2+} (Fig. 5), the number of components considered and constrains applied have been the same than for PC_3 system. The best results (lof = 9.9%) yield the normalized unitary voltammograms and the concentration profiles of Figs. 5b and c.

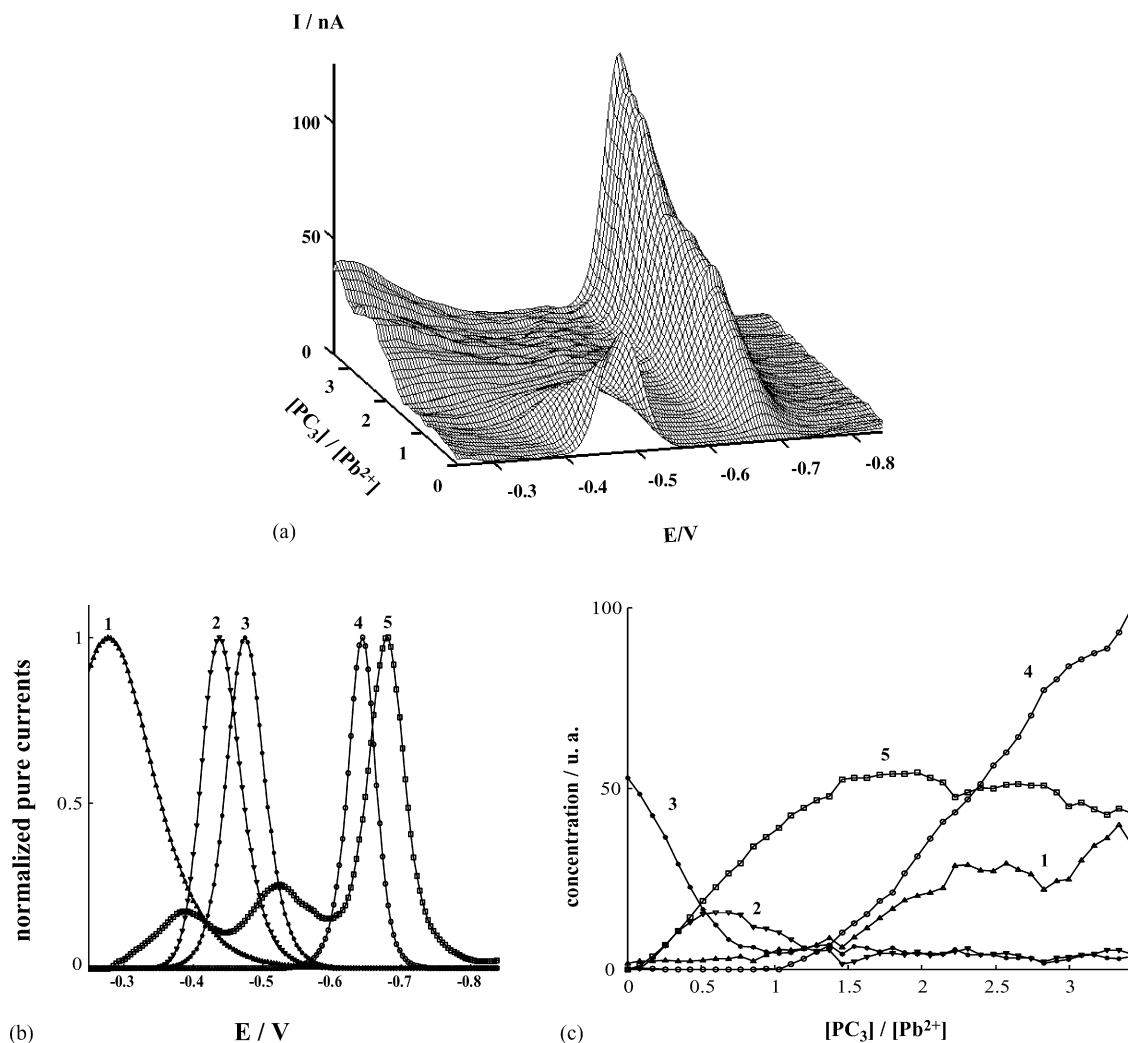


Fig. 4. Current data matrix obtained in the DPP titration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ Pb}^{2+}$ with $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3\text{Gly}$ (PC_3) at pH 6.8 (a), and the corresponding normalized unitary voltammograms (b) and concentration profiles (c) obtained in the MCR-ALS analysis of the data.

From MCR-ALS analysis, component 4 is due to the reduction of free PC_2 (the only species at the beginning of the titration) and component 2 to the reduction of free Pb^{2+} . In agreement with $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_3$ system, components 3 and 5 seem to correspond to the reduction of Pb^{2+} bound to one and two sulfur groups of PC_2 , respectively. Finally, component 1 should correspond to the anodic signal associated to component 3.

Nevertheless, in this system some problems make more difficult to extract a complexation picture from this experiment. At first, occurrence of the second complex (related to component 3) is quite lower, and it comes out from a zone where anodic signals associated to the first complex are significant. This, together with the overlapping of components 4 and 5, hinders the good resolution of characteristic M:L ratios to deduce when the different species appear, disappear or stabilize. At second, when the signal associated to the first complex (component 5) reaches a quasi-plateau, a progressive potential shift to more negative values takes place, as in the $\text{Pb}^{2+}/\text{Cys-Gly}$ system, but in minor extension. Then, if two different components are considered for this unique signal, the concentration profile of the first complex would be too affected; but, if we consider only one component

for this signal (component 5), its concentration profile does not stabilize until a M:L ratio much higher than the real one.

Despite these considerations, a tentative complexation process can be formulated by comparison with the $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_3$ system. When Pb^{2+} is added to PC_2 , a very stable 1:1 complex (related to component 5) is formed until a M:L ratio of ca. 1.0 (Fig. 5c), where free PC_2 decreases significantly (component 4). For such a deduction, a projection of the initial profile must be observed at a ratio of ca. 1. Deviations from that projection are because of the strong overlapping of the signals. As in $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_3$, Pb^{2+} is bound to two thiol groups of the same PC_2 molecule. When more Pb^{2+} is added, new components 1 and 3 (with small concentration profiles) appear. Component 3 seems to correspond to the reduction of a Pb^{2+} bound to only one thiol group (as its potential at quite less negative value than for component 5 indicates) and component 1 to its anodic process. Since free Pb^{2+} (component 2) does not appear until a ratio of ca. 1.2 (determined from the extrapolation of final part of its concentration profile) and free PC_2 is absent, a small fraction of 1:1 $\text{Pb}^{2+}/\text{PC}_2$ complex could liberate one thiol group to allow the entrance of a new Pb^{2+} in the structure (Table 1). The calculated concentra-

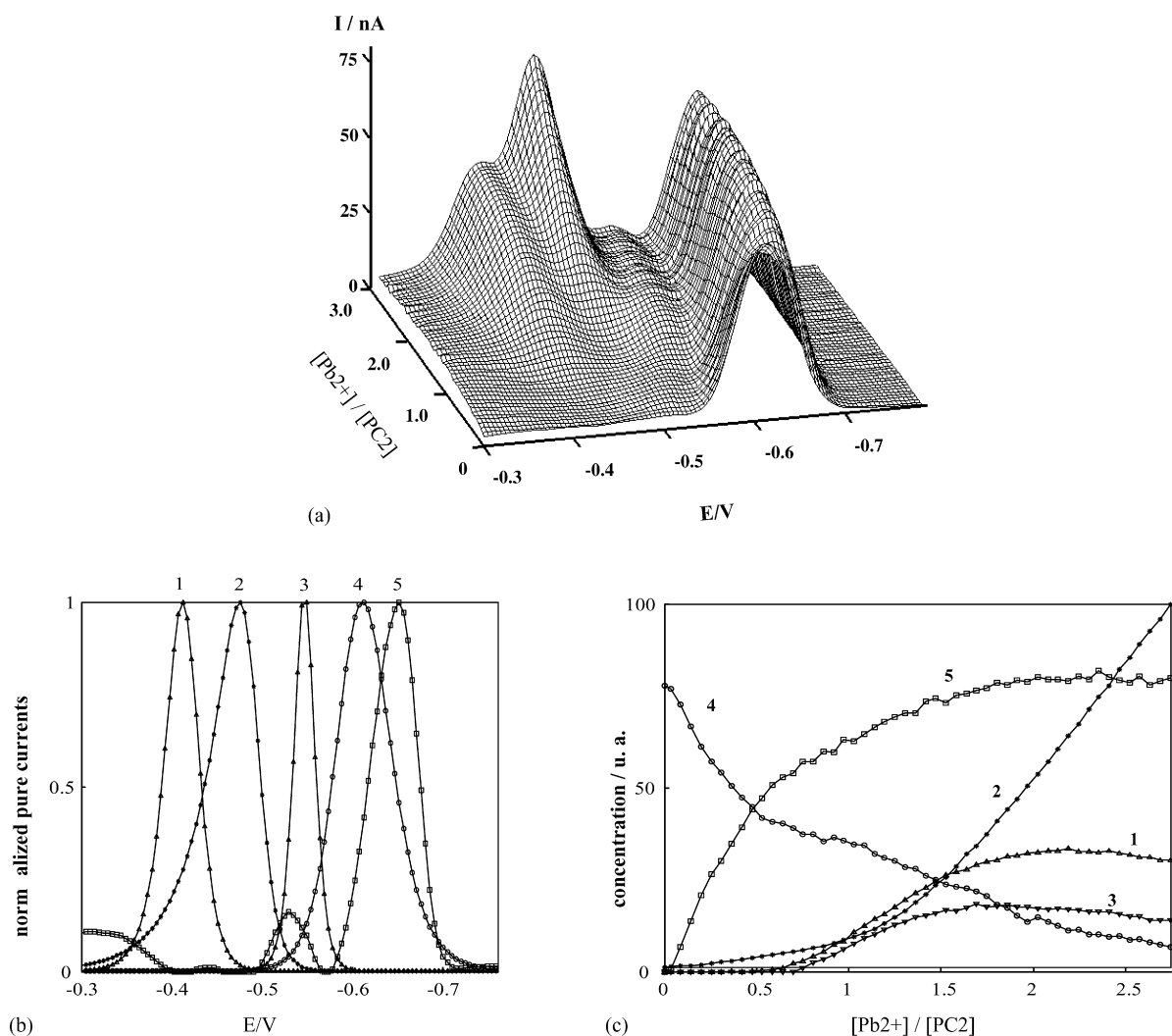


Fig. 5. Current data matrix obtained in the DPP titration of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (γ -Glu-Cys) $_2$ Gly (PC_2) with Pb^{2+} at pH 6.8 (a), and the corresponding normalized unitary voltammograms (b) and concentration profiles (c) obtained in the MCR-ALS analysis of the data.

tion profile of the first (1:1) complex (related to component 5) does not fall due to the signal shift mentioned before, and the resulting ambiguity created in the MCR-ALS analysis. At the end of the experiment, at M:L ratios of 1.5 or higher, it can be concluded that the most important fraction of PC_2 is strongly bound by one Pb atom forming a ML complex, and the rest of PC_2 fraction is more weakly bound by two Pb atoms, forming a M_2L complex.

The titration of PC_2 with Pb^{2+} gives similar data than that for PC_3 (Fig. 4a) but, in this case, two highly overlapped anodic signals can be seen at both sides of free Pb^{2+} signal. These features cause a high ambiguity in MCR-ALS results, thus being impossible to precise a concentration profile for free Pb^{2+} and, therefore, an acceptable complexation sequence.

5. Conclusions

The combined use of DPP and MCR-ALS allows us to detect the presence of differently bound Pb(II) providing information to propose complexation models between lead and different Cys-containing peptides. From the analysis of the concentra-

tion profiles and taking into account the relative position of the DPP peaks, tentative structures for $Pb^{2+}/\text{Cys-Gly}$, Pb^{2+}/PC_2 and Pb^{2+}/PC_3 systems are proposed (Table 1). The results are very satisfactory because of the additional problem due to the interference from the anodic mercury signals in the presence of those ligands that overlap with the peaks of the free metal ion and the metal complexes. Only the Pb^{2+}/γ -Glu-Cys system could not be satisfactorily resolved.

Thus, the valuable information obtained in this study (although requiring further confirmation by structural techniques) suggests that the methodology used can play a key role in the study of metal binding by PC_n .

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (Project BQU2003-07587-CO2-01), and thank the Generalitat of Catalonia (Project 2005SGR-00186). Aristides Alberich thanks the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología for a Ph.D. grant.

References

- [1] B. Suresh, G. Ravishankar, *Crit. Rev. Biotechnol.* 24 (2004) 97.
- [2] W.E. Rauser, *Cell Biochem. Biophys.* 31 (1999) 19.
- [3] M.H. Zenk, *Gene* 179 (1996) 21.
- [4] C.S. Cobbett, *Plant Physiol. Biochem.* 123 (2000) 825.
- [5] J.A. de Knecht, N. van Baren, W.M. Ten Bookum, F.S. Wong, W. Harro, P.L.M. Koevots, H. Schat, J.A.C. Verkleij, *Plant Sci.* 106 (1995) 9.
- [6] J.F. Souza, W.E. Rauser, *Plant Sci.* 165 (2003) 1009.
- [7] M. Dabrio, A.R. Rodríguez, G. Bordin, M.J. Bebianno, M. De Ley, I. Sestáková, M. Vasak, M. Nordberg, *J. Inorg. Biochem.* 88 (2002) 123.
- [8] G. Bordin, *Guest Ed., Mol. Cell. Biol.* 46 (2000) (special issue on Metallothioneins).
- [9] G. Scarano, E. Morelli, *Electroanalysis* 10 (1998) 39.
- [10] I. Sestáková, H. Vodickova, P. Mader, *Electroanalysis* 10 (1998) 764.
- [11] J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B.S. Grabaric, M. Esteban, E. Casassas, *J. Electroanal. Chem.* 393 (1995) 7.
- [12] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49 (and references therein).
- [13] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86.
- [14] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, I. Sestáková, J. Velek, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 520 (2002) 111.
- [15] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 778.
- [16] M.J. López, C. Ariño, M.S. Díaz-Cruz, J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5609.
- [17] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis* 15 (2003) 1177.
- [18] G. Scarano, E. Morelli, *Biometals* 15 (2002) 145.
- [19] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *J. Electroanal. Chem.* 516 (2001) 110.
- [20] M. Heyrovsky, P. Mader, V. Veselá, M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.* 369 (1994) 53.
- [21] W. Stricks, I.M. Kolthoff, *J. Am. Chem. Soc.* 74 (1952) 4646.
- [22] R.A.F. Bullerwell, *J. Polarogr. Soc.* 9 (1963) 7.
- [23] J.M. Séquaris, *Comp. Anal. Chem.* 27 (1992) 115.
- [24] A.I. Vogel, *Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, fifth ed., Longman, London, 1989.
- [25] F. Berbel, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 432 (1997) 243.
- [26] The Matlab Version 5.3. R. 11, Mathworks Inc., Cochituate Place, MA.
- [27] R. Tauler, B. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [28] J.M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M.S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *Analyst* 126 (2001) 371.

11.2 Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy

A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Analytica Chimica Acta 584 (2007) 403-409

La falta de linealidad en los datos polarográficos puede estar provocada por diversos fenómenos físico-químicos y cinéticos que se dan en la capa de difusión, como la adsorción de especies en la superficie del electrodo, corrientes capacitativas importantes, pérdida de reversibilidad de algún proceso redox o a la formación de complejos electroquímicamente lábiles. En la mayoría de casos, esta falta de linealidad se manifiesta por un desplazamiento lateral progresivo de las señales que fácilmente puede conducir a un modelo de complejación equívoco o incompleto.

Tras constatar que éste es uno de los principales problemas que impiden la resolución completa de los sistemas PC/Pb(II), se pensó en utilizar alguna técnica espectroscópica que ayudara a discriminar entre las especies químicas reales y los fenómenos electroquímicos ajenos a la complejación. La elección de dicroísmo circular se basó en la independencia de sus medidas con respecto a la polarografía pues, de una manera simplista, se puede decir que la primera mediría la conformación espacial de los ligandos y complejos, y la segunda la fuerza de los enlaces metal-grupo funcional, considerando así diferentes aspectos de las especies en los equilibrios de complejación.

Una de las características que hace al método MCR-ALS tan eficaz es que se puede aplicar a varias matrices de datos experimentales, bien sea analizando diversos experimentos registrados con la misma técnica (matriz aumentada en las columnas) o un mismo experimento registrado con diferentes técnicas (matriz aumentada en las filas), de forma que la información única extraída sea más provechosa que la de los experimentos analizados individualmente. Su aplicación a experimentos llevados a cabo con diferentes técnicas espectroscópicas es bastante común [2, 3], y también en nuestro grupo de investigación se ha hecho lo mismo con diferentes técnicas electroquímicas [4, 5], pero éste es el primer trabajo en el que se analiza mediante MCR-ALS una matriz aumentada con datos provenientes de valoraciones registradas por una técnica electroquímica y otra espectroscópica.

Para comprobar que las adaptaciones metodológicas necesarias para pasar del análisis de matrices electroquímicas al análisis de matrices espectro-electroquímicas fueran correctas, se escogió un sistema sencillo como el Cys-Gly/Cd(II), que presenta desplazamiento lateral de señales pero no solapamiento entre ellas [6]. De todas formas, el estudio de la complejación de los fragmentos del GSH resulta interesante *per se*, pues

ayuda a esclarecer el proceso de formación de las fitoquelatinas y clarifica algunos aspectos sobre la contribución de los grupos funcionales no tiólicos.

Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II)/glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy

Arístides Alberich, 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

Received 7 June 2006; received in revised form 20 November 2006; accepted 27 November 2006

Available online 3 December 2006

Abstract

Multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) is applied for the first time to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data. Then, a data analysis is done with augmented matrices constituted by Differential Pulse Polarography and Circular Dichroism data submatrices. The use of proper, and different for each submatrix, constrains in the iterative ALS optimization allows to obtain chemically meaningful results constituted by a common matrix containing the concentration profiles, and two matrices with the pure electrochemical and spectroscopic signals. MCR-ALS is applied to the study of the complexation of Cd by Cys-Gly, a glutathione-fragment of great interest for understanding metal-phytochelatin complexation.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Multivariate curve resolution; Cadmium; Glutathione-fragment; Circular dichroism spectroscopy; Voltammetry

1. Introduction

Multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) is a very powerful and versatile soft modelling method for the study of dynamic multiequilibria by spectroscopic means, including metal ion complexation [1,2], protein conformations involved in folding processes [3,4] (including intermediate species that cannot be isolated by physical or chemical means), resolution of DNA structures present in solution [5] and interactions of solutes with binary solvent mixtures [6]. For some of these applications a three-way analytical method is proposed to deal with multispectroscopic monitoring (through a row-wise augmented data matrix) or with several experiments done in different conditions using the same technique (a column-wise augmented matrix) [7].

Simultaneously, MCR-ALS method was adapted to be used for electrochemical data, incorporating the special characteris-

tics of those data as compared to the spectroscopic ones. This implies not only some methodological adaptations but also some conceptual changes in data interpretation and the inclusion of new hard constrains, as the signal-shape one [8–11], as it has been also done in MCR-ALS application to kinetic problems [12,13]. MCR-ALS has been applied to several voltammetric techniques, including cyclic voltammetry [10], and to a variety of metal complex systems such as those of Cd²⁺ and Zn²⁺ with α - and β -metallothionein (MT) domains [14] and the phytochelatin (PC) (γ -Glu-Cys)₃Gly [15]. Moreover, MCR-ALS has been also applied to voltammetric detection in HPLC [16], and compared with the classical amperometric one, in the same way as diode array detection (DAD) in HPLC [17–19] and CE [20].

Although simultaneous MCR-ALS analysis of data from different spectroscopic [4–7] and electroanalytic [21] techniques has been done, at the best of our knowledge, the simultaneous analysis of augmented matrices combining data from both types of techniques has been not yet explored. This combination should be very useful to overcome some uncertainties in the analysis of electrochemical data related with the simultaneity of processes or small shifts of the signals.

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

It is important to remark that signals that appear in voltammetry are related not only with the reduction of the metal ion (free or complexed) but also with the anodic oxidation of mercury (from the electrode) enhanced by the presence of ligands. Other phenomena that affect signals are adsorption of species on the electrode surface and the association–dissociation kinetics of complexation [8,9]. These facts can produce loss of linearity and, as a consequence, the appearance of additional components in MCR-ALS analysis without electrochemical meaning. By this reason, the combination of electrochemical data with spectroscopic ones could have the advantage that spectroscopic measurements are based on totally different principles and can help to confirm the doubtful components found in voltammetric data analysis. In this sense, circular dichroism appears as a useful tool in the study of these systems, since it is especially sensitive to conformational changes of peptides caused by complexation by metal ions [22,23]. Moreover this technique can be applied to relatively diluted solutions like those studied in voltammetry, which is an advantage in comparison with other spectrometric techniques like EXAFS, ^{113}Cd RMN and SEM that need solid or very concentrated samples.

In the present paper the above mentioned simultaneous MCR-ALS analysis, applied to data obtained by differential pulse polarography (DPP) and circular dichroism (CD), is presented for the first time. It has been applied to the study of the complexation of Cd^{2+} by the glutathione-fragment Cys-Gly due to the interest of the low molecular weight PC-related thiols in the metal-PC understanding concerning marine phytoplankton and heavy metal detoxification studies [15,24–26].

2. Experimental section

2.1. Chemicals and instrumentation

Cys-Gly was provided by Sigma with a purity of 85% (as fluoroacetate salt). All reagents were a.r. grade from Merck and Sigma. Cd^{2+} -stock-solutions were prepared from $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and standardised complexometrically. PIPES and KNO_3 were used for pH and ionic strength control. All solutions were prepared in deaerated ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 system, Millipore).

DP polarographic measurements were performed in a 757VA Computrace (Metrohm) using a static mercury drop electrode (SMDE, drop area of 0.6 mm^2), an $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ reference electrode and a glassy carbon auxiliary electrode. An Orion SA 720 pH-meter was used for pH control. All measurements were carried out in glass cell at room temperature (20°C) under purified N_2 atmosphere. Measurements were made at pulse time of 50 ms, pulse amplitude of 50 mV, drop time of 0.8 s and potential step of 4 mV.

CD spectra were obtained in a Jasco Spectropolarimeter, model 810. Measuring solutions were scanned at 1 nm intervals with a 50 nm min^{-1} scan speed, 1 nm bandwidth and 1 s response from 280 to 200 nm at room temperature. A cylindrical quartz cell of 10 mm lightpath was used. The CD spectra recorded were the mean of three accumulations for each run.

2.2. Procedures

Metal-ligand titrations were performed by DPP at $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ PIPES ($\text{pH} = 7.5$)– 0.01 mol L^{-1} KNO_3 medium, and by CD at $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ PIPES ($\text{pH} = 7.5$) medium.

In DPP titrations, 20 mL of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cys-Gly solution are placed into the cell and purged with pure nitrogen during 40 min. Then, DPP curves are recorded. After that, aliquots of a $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Cd^{2+} -solution are added and DPP curves recorded. Between additions, solutions are purged and mechanically stirred for 1.5 min. In CD titrations, to 20 mL of $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Cys-Gly solution, aliquots of a $4 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Cd^{2+} -solution are added. CD spectra are recorded transferring the required volume to the quartz cell. No influence of oxygen was observed during CD spectra recording. The experiments were designed to have measurements by both techniques at equal metal-to-ligand ratios.

3. Theory and data treatment

DPP curves and CD spectra are smoothed and baseline-corrected, when necessary, and converted into data matrices by means of some homemade Matlab programs [27]. To combine the DPP and CD submatrices into an augmented data matrix, both submatrices must contain the same number of rows (Fig. 1) and must share the same distribution of the chemical species along the experiments (*i.e.*, a common matrix **C** of concentration profiles). Ideally, this condition can be fulfilled using exactly the same total concentrations of metal and ligand in both DPP and CD titrations, but this is not possible because the concentrations required for CD measurements are higher than these for DPP experiments (high concentrations produce amalgam saturation in DPP and low concentrations cause poor signal-to-noise ratios in CD). Thus, it is necessary to design experiments at different total concentrations able to yield comparable fractions of each species. In the case of weak complexes, the fraction of the species is practically determined by the total ligand concentration (provided it is in excess as compared to the total metal). In contrast, for strong complexes like these considered in the present work, fractions of the species depend specially on the metal-to-ligand ratio and the more significant changes are observed when the ligand is not in excess or even in default as compared to the metal. Thus, in the present work, CD and DPP experiments have been performed at different total concentrations but at the same values of metal-to-ligand ratio.

The MCR-ALS method for the analysis of electroanalytical data is summarized elsewhere [8,9], and several homemade programs implemented in Matlab are available at <http://www.ub.es/gesq/mcr/mcr.htm>. However, because of the combination of two completely different types of data, some considerations must be done in the analysis of the augmented matrix:

- (i) due to the fact that DPP currents and CD absorbances are of very different magnitude, submatrices must be scaled in order to have a similar weight on the iterative ALS optimization of the augmented data matrix; in a first approach,

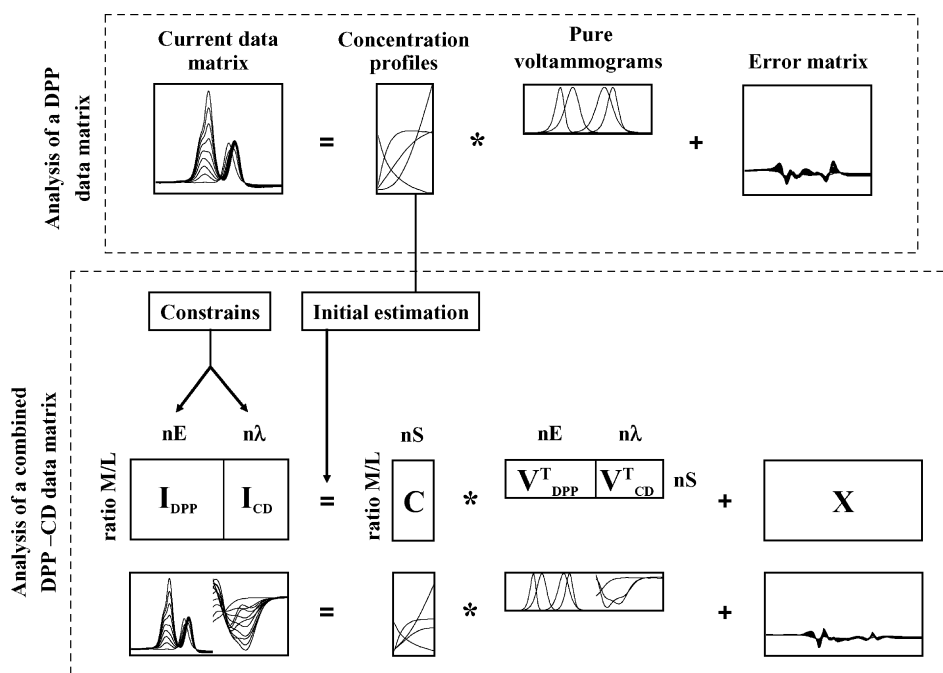


Fig. 1. Scheme of the MCR-ALS analysis of a voltammetric data matrix (above) and scheme of the simultaneous MCR-ALS analysis of an augmented matrix obtained by the proposed combination of voltammetric and spectroscopic experiments (under).

this is done by dividing both submatrices by its maximum value prior to their combination into an augmented data matrix. However, further exhaustive studies would be required to develop more accurate weighting methods that take into account the number of elements of each matrix, the data reproducibility and the positive/negative nature of CD-data.

- (ii) in MCR-ALS the analysed (augmented) matrix is finally factorized as a product of a matrix \mathbf{C} , containing the evolution of the concentrations, and a matrix \mathbf{V}^T , containing the pure response vectors, for each one of the nS components (Fig. 1). Because submatrices are from different types of measurements, \mathbf{V}^T is constituted by two parts: one of pure DPP-signals and another one of pure CD spectra. However, as above mentioned, matrix \mathbf{C} is unique and common to both techniques because species responsible of the variations and the experimental conditions are the same.
- (iii) the concept of *component* is a critical point. For spectroscopic data component is associated to pure chemical species in solution [1,2], but for electrochemical data component must be associated to a single electrochemical process giving a signal, including not only redox processes but also some other possible phenomena like, for instance, electrode adsorption of a species [8,9] or capacitive currents due to the charging of the electrical double layer at the electrode surface. Anyway, in many situations, a single electrochemical process is produced by a single species. The number of components of each submatrix can be evaluated by singular value decomposition (SVD) [8,9]. Although this tool can be only considered as a guide since sometimes a component could be neglected if its concen-

tration profile or its response vector is a lineal combination of others.

- (iv) the expected improvements for this new MCR-ALS approach should come from the combination of techniques with different sensitivities respect to the chemical species. That is, in the combined treatment it must be considered which components produce variations on which matrix, and drive this through constrains in ALS. The CD-active species are the free ligand and the complexes in solution. Concerning the electrochemical measurement, the interpretation is more subtle. In principle, the DPP-active species are the free metal ion and the electroactive metal complexes, *i.e.*, those species in which the metal ion can be reduced inside the time window of the electrochemical measurement. Moreover, in the present case, as in MT [14], PC [15] and other thiol-containing compounds [10], ligand also yields some signal.
- (v) because of the distinctive response of DPP and CD to every species, the constrains introduced in ALS to assure a physico-chemical meaning to the mathematical solution are applied independently to both submatrices. Then, for instance, the non-negativity constrain is imposed to DPP currents (only positive or negative) but not to CD absorbances because of the typical shape of CD signals (containing both positive and negative values). The signal-shape constrain, introduced for MCR-ALS of voltammetric data [8–11], restricts pure signals to the expected peak shape of some kinds of voltammograms by fitting it to a proper parametric equation, *e.g.* asymmetric logistic peak or logistic power peak. Thus, this constrain is only applied to DPP submatrix because a peak shape is expected for DPP-signals,

whereas no predetermined shape is expected for CD spectra.

- (vi) taking into account the impossibility of applying a closure constrain (*i.e.*, the mass balance) to the matrices obtained at two different concentration levels, a normalization of the signals has been made along the MCR-ALS iterations. Considering that such normalization should be common to both DPP and CD parts of each pure signal, it has been made by dividing the pure signal by its maximum absolute value (indeed, alternative normalization procedures have been tested but the results were similar).
- (vii) iterative ALS optimization needs of a proper initial estimation of \mathbf{C} or \mathbf{V}^T matrix. After several attempts with a variety of tools (homemade Matlab programs as Peakmaker [15], SIMPLISMA [28,29] or Evolving Factor Analysis [8]), the \mathbf{C} matrix of concentration profiles obtained in the MCR-ALS analysis of DPP-data submatrix was the most satisfactory estimation (as outlined in Fig. 1).

The analysis of the resulting \mathbf{C} and \mathbf{V}^T matrices yields in both cases a chemical information that allows us to obtain the possible stoichiometries (provided by the metal-to-ligand ratios where species appear, disappear or stabilize) and some suggestions about the relative stability of metal binding and, as a consequence, of the complexes (the more negative is the DPP-peak potential, the more stable is the complex). As it can be seen, the main useful information comes from X -axis for what the application of a closure constrain is not necessary.

In Fig. 1 matrix \mathbf{X} represents the relative error of the factorization, expressed as percentage of lack of fit (lof), and the goodness of the fitting.

In the following the components described from MCR-ALS analysis are numbered according to their situation on the potential axis of the DPP part in \mathbf{V}^T matrix.

4. Results and discussion

Fig. 2 shows the DPP-CD augmented data matrix obtained from the addition of Cd^{2+} to Cys-Gly. Evolution of polarograms appears on the left-hand side and that of spectra on the right-hand side. First, both submatrices are studied separately and then a row-wise augmented DPP-CD-data matrix is made and analysed.

4.1. Analysis of the DPP submatrix

In the DPP submatrix, three signals (at *ca.* -0.650 , -0.700 and -0.850 V) are clearly observed. However, signal at *ca.* -0.850 V undergoes a slow but progressive shift to more negative potentials (see window in Fig. 2). Singular value decomposition (SVD) of DPP submatrix yields four components (eigenvalues) to explain data variation (results not shown). Then, two components are necessary to explain the evolution of the signal at *ca.* -0.850 V.

The best MCR-ALS results (Fig. 3a and b; lack of fit of 7.8%) were achieved applying constrains of non-negativity for both concentrations and signals, selectivity for Cys-Gly at the begin-

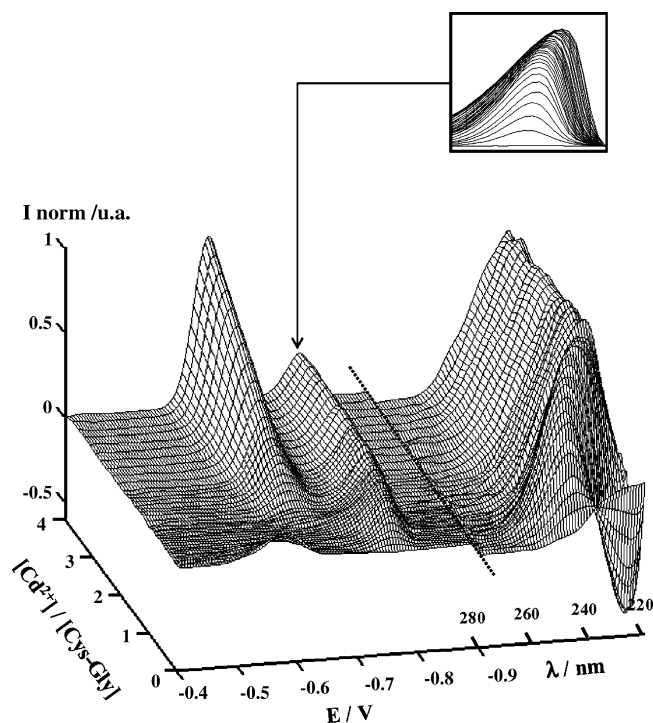


Fig. 2. Augmented matrix containing electrochemical and spectroscopic data. On the left-hand, DP polarograms measured during the titration of a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cys-Gly solution with Cd^{2+} in the presence of 0.01 mol L^{-1} KNO_3 . On the right-hand, CD spectra measured during the titration of a $10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Cys-Gly solution with Cd^{2+} . Both titrations at pH 7.5 in $10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ PIPES buffer.

ning of the titration, and DPP-signal-shape for all components. Components 1 and 2 are redox processes of free Cys-Gly and free Cd^{2+} , respectively, whereas components 3 and 4 seem to be associated with the reduction of Cd^{2+} bound to Cys-Gly in different ways. This means that two complexes could be formed, but the interpretation of matrix \mathbf{C} shows some problems. From concentration profiles in Fig. 3b (matrix \mathbf{C}), it seems that a 1:2 Cd^{2+} :Cys-Gly complex is formed: component 3 appears from the beginning of the titration and reaches a maximum at a ratio close to 0.5, when free Cys-Gly disappears. In this complex Cd^{2+} is strongly bound to thiol groups of two Cys-Gly molecules, as demonstrated by its peak potential, quite more negative than that of free Cd^{2+} reduction.

Because of its behaviour (see window in Fig. 2), component 4 could be the reduction of a new complex, or whatever including a loss of linearity of the electrochemical response (as loss of reversibility or electrodic adsorption effects). If component 4 is assumed to be a new complex, it must be a little bit more stable than the first one, as indicated by its more negative peak potential. But owing to the fact that component 4 appears when added Cd^{2+} remains as free cation, it seems that the unique possible explanation is that the new complex is the same $\text{Cd}(\text{Cys-Gly})_2$ complex with an equivalent but slightly stronger metal-thiol bond (maybe due to a different chemical environment), in such a way that the Cd^{2+} reduction potential would become a little more negative.

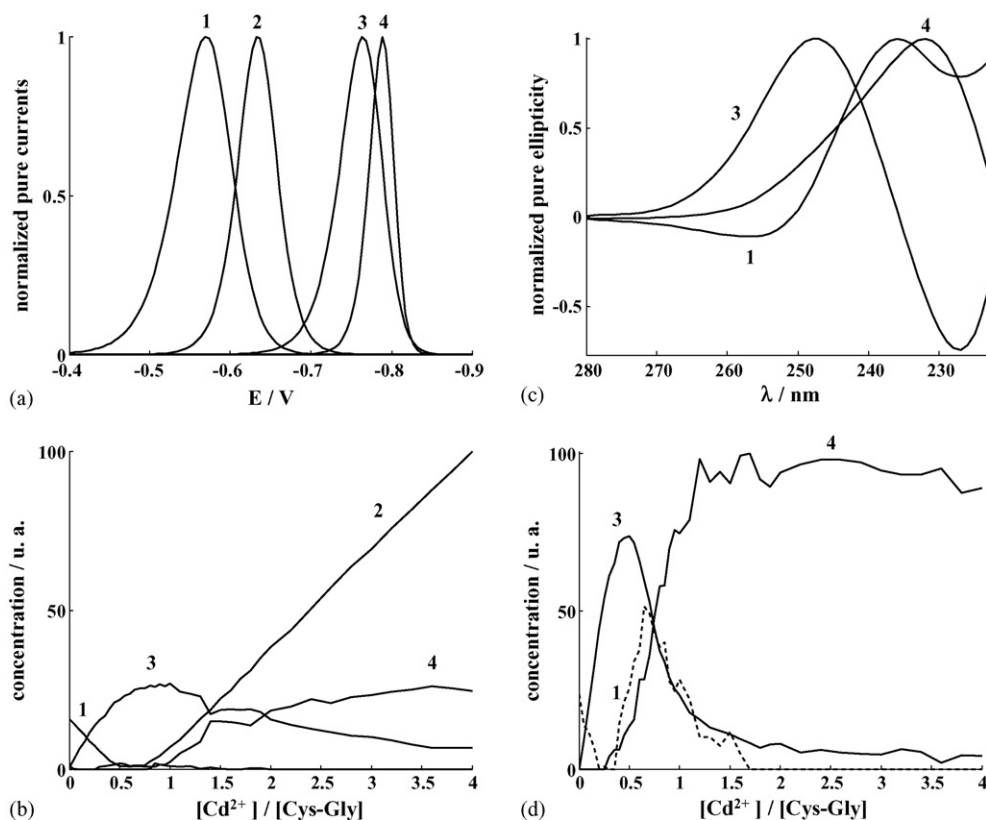


Fig. 3. Normalized pure voltammograms (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS analysis of the electrochemical submatrix; normalized pure spectra (c) and concentration profiles (d) obtained in the MCR-ALS analysis of the spectroscopic submatrix. Components are: Cys-Gly (1), Cd^{2+} -ion (2), $\text{Cd}(\text{Cys-Gly})_2$ (3) and $\text{Cd}_2(\text{Cys-Gly})_2$ (4).

4.2. Analysis of the CD submatrix

The active species in CD are free Cys-Gly and its complexes. Fig. 2 (right-hand part) shows the evolution of CD-signals from the free Cys-Gly spectrum (the first one) to that obtained at Cd^{2+} -added excess (a sharp peak at *ca.* 230 nm), passing through a spectrum with a maximum at *ca.* 240 nm and a minimum at *ca.* 230 nm (see further Fig. 3c). This behaviour suggests the presence of at least three CD-active components that are confirmed by the SVD analysis of CD-data matrix, although the third component seems to be of little importance.

Applying constrains of non-negativity for concentration and selectivity for Cys-Gly at the beginning of the titration, the MCR-ALS results entail a lack of fit of 5.4%. Fig. 3c shows pure CD spectra for component 1 (Cys-Gly) and for two different complexes (components 3 and 4), but not for free Cd^{2+} , as expected. Fig. 3d confirms that a 1:2 Cd^{2+} :Cys-Gly complex is formed since the beginning of the titration (component 3, maximum at ratio 0.5) but now disappears to form component 4 that progresses at values of metal-to-ligand ratio between 0.5 and 1, when there is not free cadmium yet. Because of thiol group of Cys-Gly is bound forming the $\text{Cd}(\text{Cys-Gly})_2$ complex, component 4 could be due to a 2:2 Cd^{2+} :Cys-Gly complex, where the second Cd^{2+} -ion would be weakly bound to the carboxylate group. The binding of Cd^{2+} to the amine group does not seem very likely at pH 7.6.

The concentration profile of free Cys-Gly (component 1, dashed line) really does not hold this complexation sequence since it depletes under a ratio-to-ligand value of 0.5 and reappears for a while with component 4. This can be overcome with a more restrictive selectivity constrain but, in this case, the solution given by MCR-ALS factorization is not entirely convergent.

4.3. Analysis of the row-wise augmented DPP-CD-data matrix

In summary, it has been stated that the different nature of measures of both techniques yields different results for the same system in study. From the analysis of polarographic data – where basically the strength of the metal binding is considered –, components 1, 2 and 3 (Cys-Gly, Cd^{2+} and $\text{Cd}(\text{Cys-Gly})_2$, respectively) are well defined, but MCR-ALS has difficulty in establishing accurately if the fourth component is an electrochemical phenomenon or a new chemical species, due to the slow and progressive shift of signals at these metal-to-ligand ratios. On the other hand, variation in CD spectra depends on the spatial conformation of free or bound ligand and, therefore, the well-defined components should be numbers 1, 3 and 4 (Cys-Gly, $\text{Cd}(\text{Cys-Gly})_2$ and $\text{Cd}_2(\text{Cys-Gly})_2$, respectively) although component 1 certainly presents a behaviour not very reasonable from a chemical point of view; this fact could be explained by the low intensity and lack of sharp-shaped of the free Cys-Gly experimental spectrum that would produce an imprecision between

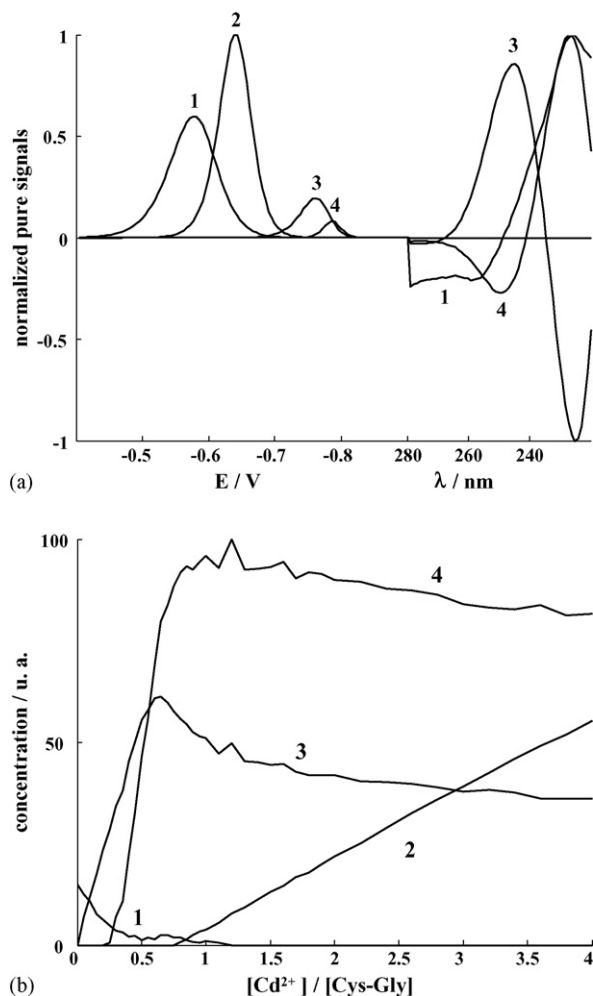


Fig. 4. Normalized unitary response vectors (pure voltammograms and spectra) (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS analysis of the augmented data matrix shown in Fig. 2. Components are: Cys-Gly (1), Cd^{2+} -ion (2), $Cd(Cys-Gly)_2$ (3) and $Cd_2(Cys-Gly)_2$ (4).

the pure spectra of components 1 and 4 given by MCR-ALS factorization. All these differences, far from being a problem, could help us to get a good picture of the whole complexation process if an analysis of electrochemical and spectroscopic data is made jointly.

As introduced in Theory and Data Treatment, the concentration profiles obtained in the previous MCR-ALS analysis of DPP submatrix (matrix C, Fig. 3b) are used as initial estimation for ALS analysis of the row-wise augmented data matrix (Fig. 2). The best MCR-ALS results (Fig. 4a and b; lof = 8.9%) were obtained applying constrains of: (i) non-negativity for concentrations (in both submatrices); (ii) non-negativity for DPP-signals; (iii) selectivity for free Cys-Gly (component 1) at the beginning of both titrations; (iv) DPP-signal-shape for all four components. Fig. 4a shows that pure voltammograms (left-hand part) and pure spectra (right-hand part) of matrix V^T are very similar to those in matrices V^T from MCR-ALS treatment of single submatrices (Fig. 3a and c) except for the pure spectra of components 1 and 4 that have solved the aforementioned ambiguity between themselves, since now they are closer to the

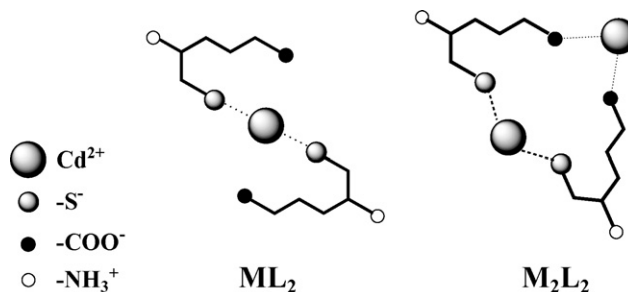


Fig. 5. Proposed structures for the formed complexes.

real CD-data. Moreover, the relative heights of pure signals have changed too because now normalization of response vectors during the ALS process is carried out taking as a reference the whole DPP-CD spectra, so that for some components the height unity is reached in the voltammetric signal part and for others in the spectroscopic signal part.

The concentration profiles obtained from combined DPP-CD-data (Fig. 4d) are qualitatively similar to DPP-data alone (Fig. 3b and initial estimation) except for component 4. Component 3 ($Cd(Cys-Gly)_2$ complex) is identified from the beginning, but now (combined DPP-CD-data) component 4 appears while $Cd(Cys-Gly)_2$ complex is still increasing. Only when component 4 stabilizes the Cd^{2+} excess remains as free ion, and this happens at a Cd^{2+} :Cys-Gly ratio around 1. So, this seems to confirm that component 4 could be due to a 2:2 Cd^{2+} :Cys-Gly complex, as it has been seen in the analysis of CD-data alone.

In any case, a complexation sequence can be summarized (Fig. 5): when Cd^{2+} is added to Cys-Gly, the large excess of peptide allows Cd^{2+} to form very stable bonds with two thiol groups. This would explain the fast increase of component 3 until M:L ratio of *ca.* 0.5 (*i.e.* two peptides per metal), where it stabilizes (Fig. 4b). This $Cd(Cys-Gly)_2$ complex is electrochemically inert (it does not dissociate inside the DPP time-window) and, therefore, signals of different species taking place in the equilibrium hold at a fix potential and can be distinguished perfectly (see first DPP curves in Fig. 2). As M:L ratio increases and free peptide decreases, at a ratio of *ca.* 0.25 the formation of more $Cd(Cys-Gly)_2$ complex is hindered, and the formation of the $Cd_2(Cys-Gly)_2$ takes place. This is not complete because free Cd^{2+} comes out at M:L ratio below 1 (Fig. 4b). The $Cd_2(Cys-Gly)_2$ complex seems to be electrochemically labile (it dissociates inside the DPP time-window) since its DPP-signal moves towards more negative potentials during the rest of the titration, thus the addition of Cd^{2+} displacing the equilibrium towards $Cd_2(Cys-Gly)_2$ complex formation.

5. Conclusions

It can be concluded that if we combine the high sensitivity and reproducibility of DPP data, and its capability to differentiate bound Cd^{2+} -ions, with the robustness of the linearity (*versus* concentration) on the spectroscopic CD signal and its selective response to different species, the simultaneous MCR-ALS analysis of those data can provide useful and sound information on complexation equilibria. Moreover, it is important to take into

account that DPP data analysis consider electrochemical processes related with metal, while CD analysis follows processes (conformational changes) of the whole molecule. Consequently, the independence of electrochemical and spectroscopic data helps to discriminate between real chemical species and instrumental artefacts. Anyway, this is still far from an unambiguous structural determination of the chemical species, which requires the use of structural techniques like XRD or NMR that, unfortunately, cannot work under the experimental conditions of the present work (very diluted solutions). It is desirable that future improvements in the features of such techniques would make possible more powerful data combinations (e.g. DPP-CD-NMR) for a conclusive determination of the complexation mechanism.

Acknowledgements

The authors gratefully acknowledge financial support from the Spanish Ministry of Science and Technology (Projects BQU2003-07587-C02-01, BQU2003-01525 and CTQ2006-14385-CO2-01, and a Ph.D. grant for A. Alberich). This research is a part of the activities of SIBA-TEQ group (2005SGR00186) from the Generalitat de Catalunya. The authors are also grateful for the many valuable comments received from R. Tauler and A. de Juan.

References

- [1] R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 18 (1993) 293.
- [2] R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski, *J. Chemometr.* 9 (1995) 31.
- [3] J. Mendieta, M.S. Díaz-Cruz, M. Esteban, R. Tauler, *Biophys. J.* 74 (1998) 2876.
- [4] S. Navea, A. de Juan, R. Tauler, *Anal. Chem.* 74 (2002) 6031.
- [5] J. Jaumot, R. Eritja, R. Tauler, R. Gargallo, *Nucl. Acids Res.* 34 (2006) 206.
- [6] S. Nigam, A. de Juan, R.J. Stubbs, S.C. Rutan, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1956.
- [7] M. Vives, R. Gargallo, R. Tauler, *Biopolymers* 59 (2001) 477.
- [8] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [9] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86.
- [10] M.S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, *Anal. Chem.* 71 (1999) 4629.
- [11] J. Mendieta, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Anal. Biochem.* 240 (1996) 134.
- [12] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 54 (2000) 123.
- [13] A. de Juan, M. Maeder, M. Martínez, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta* 442 (2001) 337.
- [14] M.J. López, C. Ariño, M.S. Díaz-Cruz, J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 5609.
- [15] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 778.
- [16] O. González-García, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *J. Chromatogr. A* 1062 (2005) 95.
- [17] K. Johnson, A. de Juan, S.C. Rutan, *J. Chemometr.* 13 (1999) 331.
- [18] E. Peré-Trepát, A. Hildebrandt, D. Barceló, S. Lacorte, R. Tauler, *Chemometr. Intell. Lab. Syst.* 74 (2004) 293.
- [19] P.J. Gemperline, E. Cash, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4236.
- [20] H. Li, F. Zhang, J. Havel, *Electrophoresis* 24 (2003) 3107.
- [21] M. Fernández, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 505 (2001) 44.
- [22] K. Osz, B. Boka, K. Varnagy, I. Sovago, T. Kurtan, S. Antus, *Polyhedron* 21 (2002) 2149.
- [23] Y. Cheng, Y.-B. Yan, J. Liu, *J. Inorg. Biochem.* 99 (2005) 1952.
- [24] V. Dorcák, A. Krezel, *Dalton Trans.* (2003) 2253.
- [25] C.S. Cobbett, *Plant Physiol.* 123 (2000) 825.
- [26] B.A. Ahner, L. Wei, J.R. Oleson, N. Ogura, *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 232 (2002) 93.
- [27] The Matlab, Version 5.3. R. 11, Mathworks Inc., Cochituate Place, MA, USA.
- [28] W. Widing, J. Guilment, *Anal. Chem.* 63 (1991) 1425.
- [29] W. Widing, S. Markel, *J. Mol. Struct.* 292 (1993) 161.

11.3 Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems

A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban

The Analyst 133 (2008) 112-125

La práctica de corregir el desplazamiento de señales no está muy extendida en electroanálisis, sobre todo en comparación con otras técnicas analíticas en las cuales suelen obtenerse picos estrechos y poco solapados; pensemos, por ejemplo, en picos cromatográficos que resultan fácilmente alineables expandiendo, comprimiendo o interpolando partes del cromatograma conforme a otro de referencia. Sin embargo, en el caso de las valoraciones voltamperométricas, el solapamiento suele ser fuerte y con estos métodos todas las señales resultarían alineadas en la misma dirección, cuando generalmente lo que se pretende es mover una de ellas dejando el resto fijas.

La creación de un programa que permita este tipo de corrección del desplazamiento de potencial debería ayudar también a la resolución de sistemas mediante *hard* y *soft modelling*, dada la gran variedad de posibles situaciones en el análisis de la complejación. Así, tras la aplicación de este programa -que hemos llamado *shiftfit*- a una matriz experimental obtenemos, por una parte, una matriz de señales corregidas \mathbf{I}_{cor} con una linealidad incrementada de los datos que la componen y que puede ser analizada posteriormente por MCR-ALS y, por otra, una matriz ΔE que incluye para cada adición y componente los valores optimizados del desplazamiento de potencial, de forma que se puedan utilizar para ajustarlos a algún modelo electroquímico siguiendo la metodología del *hard modelling*.

Aunque la formulación de este programa se pensó para mejorar el problema del movimiento de las señales anódicas en las valoraciones con Pb(II), en este artículo se comprueba su validez con tres sistemas que responden a diferentes situaciones y significados del movimiento lateral de señales: *i*) un sistema simulado de dos complejos lábiles simples sucesivos; *ii*) el sistema Cd(II)-GSH que presenta un complejo inerte y una señal anódica asociada a su formación que sufre un fuerte desplazamiento lateral; *iii*) el sistema Zn(II)-Gly, que presenta dos complejos, el primero de ellos parcialmente inerte. En cada caso se intenta determinar la imagen dinámica del proceso de complejación o sus constantes de estabilidad.

Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems†

Aristides Alberich, José Manuel Díaz-Cruz,* Cristina Ariño and Miquel Esteban

Received 13th June 2007, Accepted 11th October 2007

First published as an Advance Article on the web 2nd November 2007

DOI: 10.1039/b715667g

A new mathematical algorithm is proposed to correct the progressive potential shift of some voltammetric signals that decrease the linearity of the data. The corrected data matrix can be further analysed by Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares (MCR-ALS) and the vector including the potential shift corrections can be fitted to specific equations such as that by DeFord–Hume. A detailed discussion is given on the different cases of potential shift correction, and, in some of them, mathematical simulation is made or experimental systems [Cd(II)–glutathione and Zn(II)–glycine] are analysed.

1. Introduction

For many years, the application of Chemometrics to electro-analytical data had been quite scarce as compared to the case of spectroscopic techniques.¹ Among the possible reasons for that, the traditional use of *electrochemical hard modelling* (*i.e.* the resolution of an *a priori* model in the form of a series of equations to be fitted to experimental data), a philosophy excessively different from most chemometrical methods, based on the *a posteriori* recognition of a model from the analysis of the data variation along the experiments (what some authors call *electrochemical soft modelling*) could be mentioned. Another reason could be the lack of linearity between many electrochemical signals and the bulk concentration of the electroactive species, as a consequence of different phenomena such as electrode saturation, fast interconversion of species during the measurement, adsorption on the electrode surface, capacitive currents, oxidation of the electrode material favoured by some species, *etc.* This lack of linearity, much more usual in electroanalytical data than in spectroscopic data, hinders the application of numerous chemometrical methods to certain electrochemical systems.

Nevertheless, and despite these inherent problems, the number and variety of chemometrical applications to electrochemical data has increased considerably in the past few years.^{2,3} This is partially due to the need of reliable methods for multivariate analysis in electrochemical systems of increasing complexity like ultramicroelectrodes or arrays of electrochemical sensors^{4,5} (which are usually involved in the so-called *electronic noses* and *electronic tongues*). Additionally, the fast development of Artificial Neural Network (ANN) methods, which allow the study of non-linear systems, has expanded dramatically the range of electrochemical datasets susceptible

to chemometrical analysis.^{2–5} These methods, however, suffer from a difficult and time-consuming calibration.

Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares (MCR-ALS) is a powerful chemometrical method which allows the resolution of strongly overlapped signals with the application of a series of constraints that ensure some physico-chemical meaning to the solution. It was originally developed for spectroscopy⁶ and later successfully applied to electro-analytical measurements.⁷ The implementation of new restrictions like *peak shape*, adapted to the special character of electrochemical signals, allowed the resolution of quite intricate metal complex systems.⁸ As for linearity, it was realised that the best results were obtained when MCR-ALS was applied to unequivocally linear systems like electrochemically inert complexes, *i.e.* these for which the electrochemical measurement is much faster than the association–dissociation reactions, so that every species contributes independently to the current with a magnitude that is proportional to its bulk concentration. In the case of electrochemically labile complexes, *i.e.* those with association–dissociation equilibria much faster than the measurement, a progressive potential shift of the free metal signal is observed as the bound metal fraction increases. This signal displacement has been shown to decrease the linearity of the data, although it is possible to obtain acceptable results for moderate potential shifts.⁸ In contrast, larger potential shifts usually produce too large errors or demand too high a number of components. Finally, in some systems, potential shifts that are too large make the use of MCR-ALS impossible. This is the case, for instance, of the movement along the potential axis of some irreversible reduction signals as a function of pH.

Thus, in order to expand the use of MCR-ALS (and, eventually, other chemometrical methods) to a wider range of electrochemical systems, it seems valuable to investigate suitable methods to overcome the problems derived from the lateral movement of the signals (along the potential axis in the case of voltammetric measurements).

Although signal shift correction is a practically unexplored subject in electroanalytical chemometrics, this is a very common practice in the analysis of data obtained by

chromatography,^{9–13} capillary electrophoresis (CE)¹⁴ or NIR¹³ and NMR^{15,16} spectroscopies. Such techniques produce a large number of narrow, overlapping signals that can be used in multivariate calibration or as a fingerprint in classification or pattern-recognition methods. The x -axis position of these signals can change in a quite unpredictable way with small variations of the experimental conditions (use of different apparatus, changes in temperature or mobile phase composition, degradation of the chromatographic column, *etc.*), so that in many cases the use of warping (or alignment) procedures to line up all spectra in a consistent data matrix is mandatory. Among the most popular warping methods we can mention dynamic time warping (DTW), which uses distance as a measure of the similarity of two signals¹³ and correlation optimised warping (COW), which aligns two signals by piece-wise linear stretching and compression, the optimal alignment being determined by correlation of the aligned fragments of signals.¹³ Anyway, more sophisticated methods can be applied as, for instance, in the use of a genetic algorithm (peak alignment by a genetic algorithm, PAGA).¹⁵

These warping techniques are very useful in the case of spectra with plenty of narrow, weakly overlapping signals and are essentially based on the philosophy of expanding, compressing or interpolating in a different manner the different sections of such long spectra by comparison with a reference. Thus, in the case of much separated peaks it is possible to shift them even in opposite directions; but, in contrast, very close or overlapping peaks are always shifted in a similar way. In electroanalysis this could be useful, for instance, to line up voltammograms obtained with different reference electrodes (overall shift of the potential values) or using different potential steps or starting potentials (compression/expansion of the potential scale). Nevertheless, the goal of this work is the correction of the lateral movement of peaks much wider than these of chromatography, CE or NMR and which are overlapping in a stronger way. Moreover, the usual situation in electroanalysis is the movement of only one out of several overlapping signals, while the rest remain in the same position and overlap with the moving signal in a different way. Most warping methods would move or compress *all* overlapping signals in the same direction, so that such methods do not appear to be suitable for this purpose.

In some cases a preliminary correction based on the theoretical knowledge of the system can be possible. A pioneering experience of this strategy has been carried out with good results in the MCR-ALS analysis of NMR spectra of acidic substances, where the signal of the chemical shift of the acidic proton changes as a function of pD.¹⁷ Then, a mathematical transformation previous to the MCR-ALS analysis distributes the height of the moving peak between the respective x -positions of both the acidic and basic forms of the molecule. Although this strategy could be applied to electrochemical systems, the large variety of possible situations and *hard-modelling* approaches suggest that it would be valuable to test a different option based on a preliminary determination of potential shifts and a further analysis of them in terms of electrochemical models.

In this paper, a procedure is presented for the analysis of voltammetric data which is based on a preliminary empirical

correction of the potential shifts in comparison to some reference signals. The resulting set of corrected voltammograms, which is expected to be linear, can be further analysed by MCR-ALS and, depending on the case, the potential shifts detected in the correction can be also analysed by means of *electrochemical hard modelling*.¹⁸

2. Theory

2.1. The MCR-ALS procedure

Fig. 1a summarises the usual MCR-ALS method when applied to voltammetric linear data. Voltammograms are arranged in a matrix \mathbf{I} , where every element I_{ij} corresponds to the current measured along the scan i at the potential j . The number of components linearly contributing to the signal can be determined in different ways, *i.e.* by singular value decomposition, SIMPLISMA,^{19,20} or visual inspection of the data matrix.²¹ Then, \mathbf{I} is factorised as the product of a \mathbf{C} matrix containing the concentration profiles (*i.e.* the evolution of the concentrations of the components along the different scans) and a \mathbf{V} matrix containing the pure signal of each component k (*i.e.* its contribution to the signal per unit of concentration) plus an error matrix \mathbf{X} . This is done by means of an iterative process (ALS) which requires an initial estimation of either the \mathbf{C} or \mathbf{V} matrix. In the usual case of peak-shaped signals, the home-made program *peakmaker*²¹ can be used to estimate \mathbf{V} (see Experimental section). Finally, along ALS iterations, several constraints can be applied, such as non-negativity, closure, selectivity or signal shape (see refs 8,21,22 for more information).

2.2. The potential shift correction: general overview

The general method proposed to analyse matrices with laterally moving signals is summarised in Fig. 1b and is described in more detail in Fig. 2 and 3. It basically consists of the alignment of all moving signals to the same reference position given by the matrix of reference pure signals \mathbf{V}_0 , by means of an iterative algorithm which uses the home-made Matlab²³ functions *shiftcalc* and *shiftfit*.

Fig. 1b shows that the combined application of *shiftfit* and *shiftcalc* to an experimental matrix \mathbf{I}_{exp} affected by lateral movement of one or more signals produces:

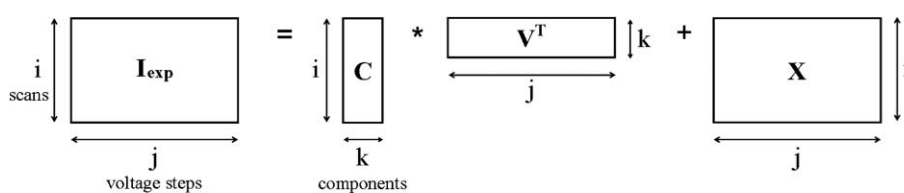
(i) A corrected matrix \mathbf{I}_{cor} where every moving signal has been aligned to a fixed (by \mathbf{V}_0 matrix) reference potential.

(ii) A matrix $\Delta\mathbf{E}$ containing the evolution of all potential shifts (as compared to the reference potentials) along the different scans. In the case of signals which are not moved, the corresponding elements of $\Delta\mathbf{E}$ equal zero.

(iii) A matrix \mathbf{C} containing a rough estimation of the concentration profiles of the components considered.

The \mathbf{I}_{cor} matrix is expected to be linear, so it can be analysed by MCR-ALS in the standard way using \mathbf{V}_0 or any other estimation of pure voltammograms to obtain optimised \mathbf{C} and \mathbf{V} matrices. The $\Delta\mathbf{E}$ matrix can be used, depending on the case, to fit electrochemical *hard-modelling* equations to determine parameters like stability constants or proton-to-electron ratios. In a further discussion, some specific cases are analysed in detail. On the other hand, the potential shift correction can be inverted from \mathbf{V}_0 , \mathbf{C} and $\Delta\mathbf{E}$ matrices by means of *shiftcalc* to

a) MCR-ALS



b) Potential shift correction

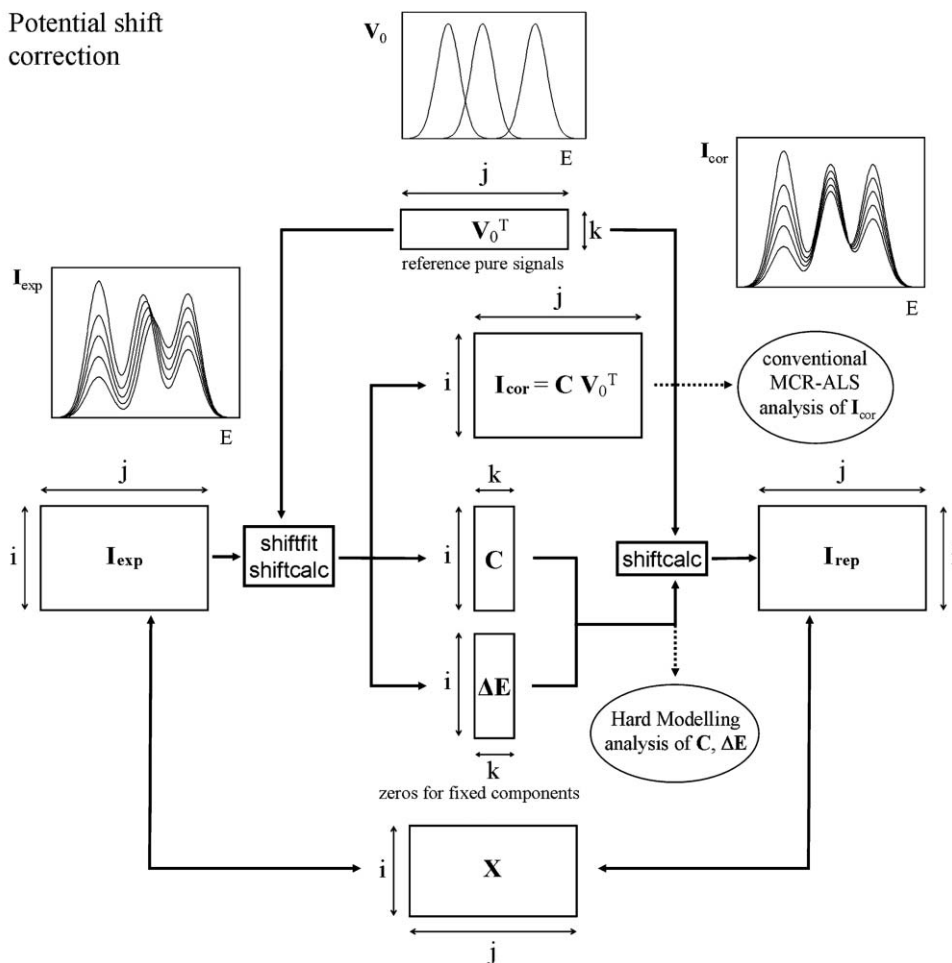


Fig. 1 Flowcharts of the standard MCR-ALS method (a) and the potential shift correction algorithm proposed in this work (b), as applied to a current data matrix \mathbf{I}_{exp} . In the first case, a concentration matrix \mathbf{C} , a pure voltammogram matrix \mathbf{V} and an error matrix \mathbf{X} are obtained. In the second case, the application of *shiftfit* and *shiftcalc* programs to \mathbf{I}_{exp} with a predefined reference signal matrix \mathbf{V}_0 produces a movement-corrected matrix (\mathbf{I}_{cor}), a concentration matrix \mathbf{C} and a potential shift matrix ΔE . The inverse process by means of the *shiftcalc* function yields the reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} that allows computation of the error matrix in the form $\mathbf{X} = \mathbf{I}_{\text{exp}} - \mathbf{I}_{\text{rep}}$. Subscripts i , j and k denote the voltammogram, potential and component number, respectively. The transposed matrix is denoted by 'T'.

obtain a reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} that can be compared to \mathbf{I}_{exp} yielding the error matrix \mathbf{X} ($= \mathbf{I}_{\text{exp}} - \mathbf{I}_{\text{rep}}$).

Finally, it must be remarked that the arbitrary and invariant character of the pure voltammograms used in matrix \mathbf{V}_0 (which remains constant along all iterations) can be refined if the optimised unit signals obtained with MCR-ALS are used again as the \mathbf{V}_0 matrix for a better movement correction of the original matrix \mathbf{I}_{exp} prior to a new application of MCR-ALS. In this way, an alternating iterative process MCR-ALS/movement correction can be carried out until the overall lack of fit does not change appreciably.

2.3. The potential shift correction: the algorithm in detail

To understand how the functions *shiftcalc*/*shiftfit* work, one must consider that: (i) *shiftcalc* can displace every signal in every voltammogram of a matrix \mathbf{I} a given potential shift ΔE to produce the matrix $\mathbf{I}_{\text{shift}}$, and (ii) *shiftfit* can iteratively optimise the values of ΔE that have to be 'discounted' from a matrix \mathbf{I}_{exp} (by means of *shiftcalc*) so that all signals in the new matrix \mathbf{I}_{cor} remain at the fixed potentials stated in the \mathbf{V}_0 matrix.

Essentially, *shiftcalc* displaces the E -axis a magnitude ΔE_{ik} which is different for each scan i and each moving component

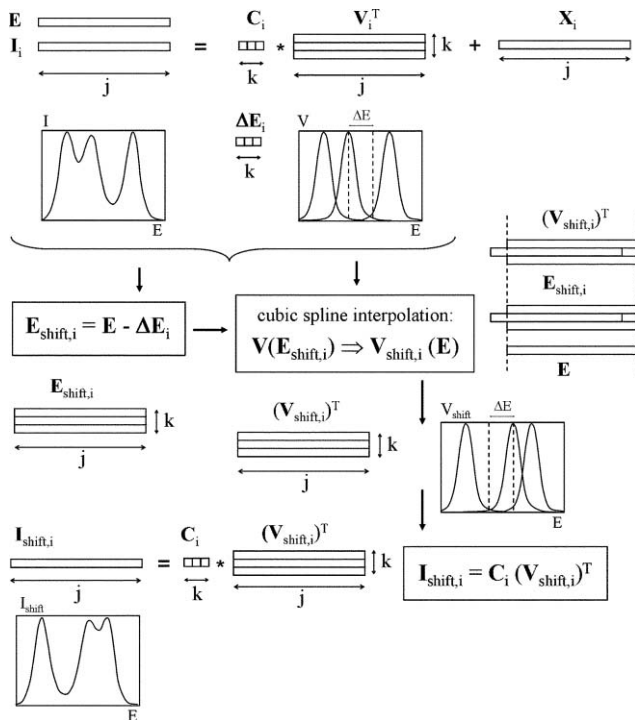


Fig. 2 Flowchart for the potential shift implementation by means of the *shiftcalc* program. Subscripts i, j and k denote the voltammogram, potential and component number, respectively. Transposed matrices are denoted by ‘T’.

k and is zero for ‘immobile’ components (Fig. 2). The full set of ΔE values can be arranged in a $\Delta \mathbf{E}$ matrix, with as many rows i as original voltammograms and as many columns k as components accepted for the \mathbf{I} matrix. For every original voltammogram, every pure signal is moved according to the corresponding ΔE_{ij} value using cubic spline interpolation to change from the E -axis to a new $E - \Delta E_{ij}$ axis. This means that using the new potential axis ($E - \Delta E_{ij}$), every column in the new pure voltammogram will correspond to a different potential as compared to the original E -axis, so that the new currents that are going to occupy these columns have to be interpolated for the new potential values by using the closest current vs. potential points in the original pure voltammogram. Then, every moved voltammogram can be obtained as the sum of the products of concentration and moved pure signal for each component.

Concerning to the program *shiftfit* (Fig. 3), it is basically a non-linear least squares iterative algorithm to optimise the set of ΔE values that, applied to the reference pure signals in \mathbf{V}_0 by means of the function *shiftcalc*, generates a reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} as close as possible to the experimental data matrix \mathbf{I}_{exp} . This operation is independently applied to each individual voltammogram i of the \mathbf{I}_{exp} matrix and can be summarised in the following steps:

(i) For each moving signal (or component) k , a potential window is defined where the corresponding pure current in \mathbf{V}_0 (*i.e.* $\mathbf{V}_{0,k}$) is higher than 20% of the maximum current of the peak in $\mathbf{V}_{0,k}$. Inside this region, a local maximum is searched (in the form of an absolute maximum whose second derivative, estimated by the Savitzky–Golay method,^{23,24} is negative). The

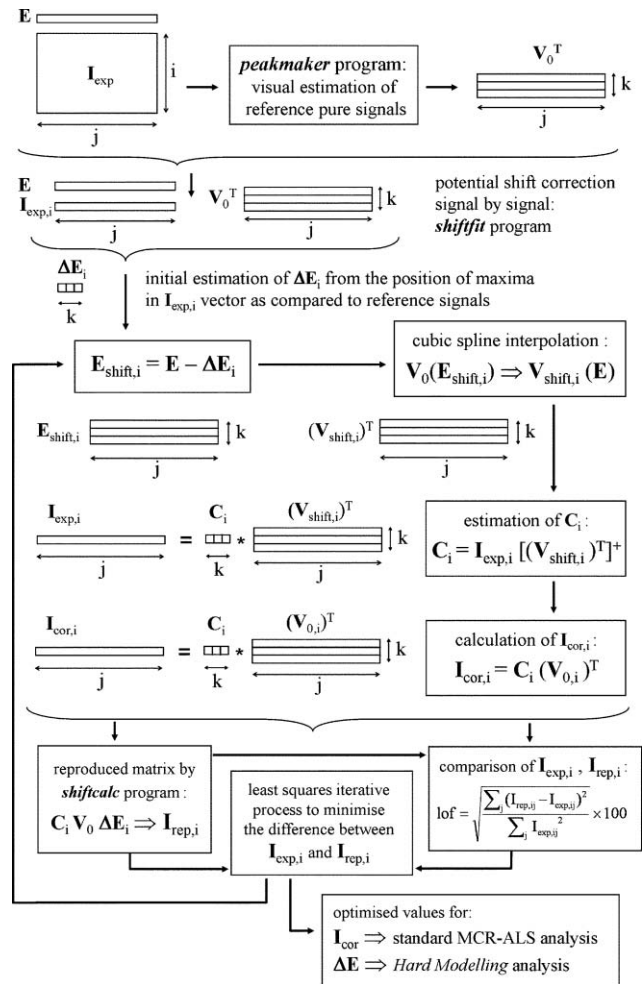


Fig. 3 Flowchart for the potential shift correction by means of the *shiftcalc* and *shiftfit* programs. Subscripts i, j and k denote the voltammogram, potential and component number, respectively. Transposed and pseudo-inverse matrices are denoted by ‘T’ and ‘+’, respectively.

difference between the x -coordinates of the maximum found in this way and the maximum in $\mathbf{V}_{0,k}$ is kept as an initial estimation of the potential shift of component k in the experiment (or voltammogram) i :

$$\Delta E_{0,i,k} = E(\text{local max in } \mathbf{I}_{\text{exp},i}) - E(\text{max in } \mathbf{V}_{0,k}) \quad (1)$$

If the signal is not moving or no local maxima are found $\Delta E_{0,i,k} = 0$.

(ii) A matrix $\mathbf{E}_{\text{shift},i}$ is made by applying for every k component the transformation:

$$\mathbf{E}_{\text{shift},i,k} = \mathbf{E} - \Delta \mathbf{E}_{0,i,k} \quad (2)$$

where \mathbf{E} contains the original potential values (a common axis for all values in \mathbf{I}_{exp}).

(iii) Cubic splines are used to interpolate from each set of $\mathbf{V}_{0,k}$ data (referred to as \mathbf{E} potentials) the values that would correspond to the new $\mathbf{E}_{\text{shift},i,k}$ axis. This yields the $\mathbf{V}_{\text{shift},i}$ matrix of ‘moved’ pure voltammograms.

(iv) An initial estimation of the concentration profiles for the experiment i is generated in the form:

$$\mathbf{C}_i = \mathbf{I}_{\text{exp},i} [(\mathbf{V}_{\text{shift},i})^T]^+ \quad (3)$$

where ‘T’ and ‘+’ denote transposed and pseudo-inverse matrices, respectively. As the iterative process goes on, more accurate values of $\Delta\mathbf{E}_i$ and $\mathbf{V}_{\text{shift},i}$ will be generated and eqn (3) would have to be applied every iteration in order to improve \mathbf{C}_i data.

(v) A dataset that we can denote as ‘xdata’ is made by combination of \mathbf{C}_i and \mathbf{V}_0 (taking advantage of the fact that the vector and the matrix have the same number of columns k). Additionally, a function F is defined which, from the set of ‘xdata’ of the experiment i and depending on the values of the $\Delta\mathbf{E}_i$ parameters, produces a set of ‘reproduced ydata’ which are the currents of the vector $\mathbf{I}_{\text{rep},i}$ and are compared to the ‘ydata’ of the experimental vector $\mathbf{I}_{\text{exp},i}$. This F function can be computed, indeed, by using the *shiftcalc* program previously described. Then, the $\Delta\mathbf{E}_i$ values can be optimised to achieve a maximum agreement between reproduced and experimental currents by means of a non-linear least squares minimisation procedure that can be summarised by the condition:

$$\begin{aligned} \min_{\Delta\mathbf{E}_i} & \left[\sum_j (F(\text{xdata}, \Delta\mathbf{E}_i) - \text{ydata})^2 \right] \\ & = \min_{\Delta\mathbf{E}_i} \left[\sum_j (\mathbf{I}_{\text{rep},i,j} - \mathbf{I}_{\text{exp},i,j})^2 \right] \end{aligned} \quad (4)$$

where the sum of squares is extended to all j elements (currents measured at different potentials \mathbf{E}_j) of the vectors $\mathbf{I}_{\text{rep},i}$ and $\mathbf{I}_{\text{exp},i}$. Such optimisation is started from the initial values $\Delta\mathbf{E}_{0,i}$ computed in point i) and is carried out by the Matlab function *lsqcurvefit*.²³ This uses an algorithm based on the interior-reflective Newton method,^{25,26} where every iteration involves the approximate solution of a large linear system using the method of preconditioned conjugate gradients (PCG). The optimisation can be also carried out by the more classical algorithm by Levenberg–Marquardt,^{27,28} but it does not allow imposing lower and upper bounds to the solution. In the case of *shiftfit*, the bounds are set between 0 and 0.3 times the wide range of potentials.

(vi) If convergence is achieved, the potential-shift-corrected vector for the experiment i , $\mathbf{I}_{\text{cor},i}$ can be obtained in the form:

$$\mathbf{I}_{\text{cor},i} = \mathbf{C}_i (\mathbf{V}_{0,i})^T \quad (5)$$

If these steps are applied independently to each one of the i voltammograms of the data matrix \mathbf{I}_{exp} , the resulting \mathbf{C}_i , $\Delta\mathbf{E}_i$, $\mathbf{I}_{\text{cor},i}$, $\mathbf{I}_{\text{rep},i}$ vectors can be column-wise integrated into the overall matrices \mathbf{C} , $\Delta\mathbf{E}$, \mathbf{I}_{cor} , \mathbf{I}_{rep} .

In order to quantify the goodness of the fitting, the percentage of lack of fit (lof) is used, which is defined in the same way as for standard MCR-ALS analysis:

$$\text{lof} = \sqrt{\frac{\sum_{i,j} (\mathbf{I}_{\text{rep},i,j} - \mathbf{I}_{\text{exp},i,j})^2}{\sum_{i,j} \mathbf{I}_{\text{exp},i,j}^2}} \cdot 100 \quad (6)$$

where $\mathbf{I}_{\text{exp},i,j}$ are the elements of the experimental matrix \mathbf{I}_{exp} , and $\mathbf{I}_{\text{rep},i,j}$ are the corresponding elements of the reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} .

It must be pointed out that in signal-moving systems a first lof can be computed for the movement correction and a second lof for the MCR-ALS process applied to the corrected matrix. However, more interesting than these separated values is the overall lof, which compares the original data matrix with that reproduced after both the \mathbf{CV}^T product of the matrices optimised by MCR-ALS and the subsequent application of the optimised potential shift. Although such an overall lof value is expected to be larger than the partial ones (since it involves both steps), in practice it should not be much larger, since the increase in the error produced by the application of a second procedure (MCR-ALS) is counter-balanced by the improvement in the fitting of the pure voltammograms, which in the movement correction step were not optimised.

2.4. The electrochemical interpretation of ΔE values

In the following, different typical situations in voltammetric analysis which produce lateral movement of the signals will be discussed.

2.4.1. Signals of irrelevant characteristic potential. This includes signals moving along the experiment which are important for the resolution of the system in terms of their concentration (or current height) evolution but whose characteristic potentials do not provide useful information for (electro)chemical equilibrium calculations. This is the case, for instance, of signals due to the anodic oxidation of mercury favoured by ligands or complexes. The group also includes signals which are useless from both potential and current points of view but are overlapping with significant signals, thus increasing non-linearity of the data and hindering the application of MCR-ALS. As examples of such behaviour, capacitive currents, curved baselines and buffer signals can be mentioned.

In any of these circumstances, the potential correction is used just to group the moving signals at the same reference potential to decrease the non-linearity promoted by their lateral movement, so that the full data matrix can be resolved by MCR-ALS. As a result, a concentration profile (\mathbf{C} matrix) is obtained for the corresponding moving component which summarises the evolution of its contribution along the experiment and, eventually, can be associated to a species concentration (*e.g.* some anodic signals are proportional to the ligand concentration). Concerning the values in the $\Delta\mathbf{E}$ matrix, they can be regarded as practically useless from a quantitative point of view.

2.4.2. Signals of simple labile metal complexes. The formation of small-sized labile metal complexes produces a negligible decrease in the characteristic (peak or limiting) current and a significant potential shift towards negative potentials as compared to the signal of the free metal ion. When successive labile complexes are formed in the presence of a ligand excess, the method by DeFord and

Hume can be applied to compute the corresponding stability constants:^{18,29}

$$F_0 = \exp \left\{ -\frac{nF}{RT} (E - E_0) - \ln \left(\frac{I}{I_0} \right) \right\} = 1 + \sum_{i=1}^m \beta_i (c_L)^i \quad (7)$$

where F_0 is the Leden function of zero order, F is the Faraday unit of charge, E_0 , I_0 are the characteristic potential and current, respectively, measured for the free metal ion in the absence of the ligand, E , I , are the same parameters obtained for a bulk concentration c_L of the ligand and β_i are the successive overall stability constants of the formed complexes (with i ranging from 1 to m). In practice, for small-sized ligands I and I_0 are virtually equal, so that eqn (7) can be used in the simplified form:

$$F_0 = \exp \left\{ -\frac{nF}{RT} \Delta E \right\} = 1 + \sum_{i=1}^m \beta_i (c_L)^i \quad (8)$$

where ΔE stands for the potential shift ($E - E_0 < 0$). In the presence of a large excess of the ligand, c_L is practically equal to the total ligand concentration c_{TL} .

When the stability constants of the successive complexes are not too large, the potential shifts are small and the voltammetric data remain quite close to linearity, thus MCR-ALS can reasonably explain the lateral movement with the progressive overlapping of a group of contiguous pure signals.^{8,30} However, large values of the stability constants could produce a dramatic decrease of linearity and hinder the analysis by MCR-ALS. In this case, the free metal ion and all their successive labile complexes can be grouped together in a unique component and the lateral movement can be corrected by means of the proposed method taking as a reference the signal of the free metal ion. The corrected current matrix \mathbf{I}_{cor} can be analysed then by MCR-ALS and, in the particular case of the grouped labile component, the concentration profile obtained in the \mathbf{C} matrix will indicate the evolution of the total concentration of the labile fraction. As for the ΔE matrix resulting from *shifffit*, the column associated with the mobile component, jointly by the corresponding ligand concentrations, can be fitted to eqn (8) to optimise the values of the successive stability constants.

2.4.3. Signals of macromolecular labile metal complexes.

When labile macromolecular complexes are formed, the addition of the ligand produces both a negative potential shift and a decrease in the peak or limiting current of the free metal ion. According to the model by de Jong *et al.*,³¹⁻³³ eqn (7) is still valid but with an important contribution of the $\ln(I/I_0)$ term and the formation of 1 : 1 complexes only. As for the currents, they decrease at increasing ligand concentration c_L , according to the equation:³¹⁻³³

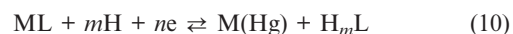
$$\phi = \frac{I}{I_0} = \left(\frac{1 + \varepsilon K c_L}{1 + K c_L} \right)^p \quad (9)$$

where ϕ is the normalised current, ε is the ratio between the diffusion coefficients of the complex and the free metal ion, K is the stability constant of the complex and p is a parameter which is $\frac{1}{2}$ for diffusion-controlled mass transport and is close

to $\frac{2}{3}$ for convective diffusion. As it happens for single labile complexes, small potential shifts do not produce a noticeable decrease of the data linearity and MCR-ALS can be successfully applied.⁷ Nevertheless, larger potential shifts could require a movement correction prior to MCR-ALS analysis and this can be made in the same way as described for small-sized labile complexes. However, the significant current decrease along complexation can make more difficult the fitting to eqn (9).

2.4.4. Irreversible signals that move with pH. Electroactive inert metal complexes can be reduced separately from the free metal ion in a more negative potential region. This usually produces linear systems that can be properly analysed by MCR-ALS, since both the signal of the free metal and that of the complex stay at fixed potentials. However, the reduction of the inert complexes is usually irreversible and, if their dissociation is favoured by ligand protonation, the characteristic potentials change as a function of pH. This movement is so important that in the experiments where pH varies by several units, data linearity is practically lost, as proved by the huge number of components detected by singular value decomposition. In practice, such systems are analysed by MCR-ALS only at fixed pH. In pH variation studies, overlapping signals are deconvoluted individually using standard procedures such as Fourier transform.³⁴

It must be noted that pH studies yield valuable information about the stoichiometry of the complexes. Thus, if we consider the scheme:



where electrical charges have been suppressed for simplicity, the evolution of the peak or half-wave potential can be related to the ratio between exchanged protons (m) and electrons (n):³⁵

$$E_p = E_{const} - \left(\frac{m}{n} \right) \frac{2.303RT}{F} \text{pH} \xrightarrow{20^\circ \text{C}} \quad (11)$$

$$E_p = E_{const} - \left(\frac{m}{n} \right) 0.058 \text{pH}$$

where E_{const} is a constant and m/n can be deduced from the slope of E_p vs. pH plots. When pH changes and several complexes coexist, their signals are overlapping and moving at different rates along the potential axis, which makes the quantification of peak potentials quite difficult. The proposed potential shift correction can be helpful for this purpose, since it provides a ΔE matrix that can be used to fit m/n ratios by means of eqn (11) and the further MCR-ALS analysis of corrected data yields the evolution of the concentration of each species with pH (\mathbf{C} matrix).

2.4.5. Quasi-inert metal complexes. When an inert metal complex is formed, it suffers no significant dissociation during the voltammetric measurement. Then, the reduction signal of the free metal ion stays at a fixed potential and its peak or limiting current changes proportionally to the remaining concentration of the free metal. If the inert complex is electroactive, its corresponding reduction signal appears at a more negative and fixed potential and the peak or limiting current becomes proportional to the complex concentration. Under these conditions, the system is perfectly linear.

However, if a noticeable complex dissociation takes place during the voltammetric measurement, the signal of the free metal is increased and moved to more negative potentials as compared to the totally inert situation. As for the signal of the complex, it stays at the same potential but its current is decreased.³⁶⁻⁴⁰ As a consequence of the movement of the free metal signal, the partial dissociation of inert complexes (quasi-inert situation) causes a decrease of the data linearity that in extreme cases can hinder their MCR-ALS analysis.

The proposed method for potential shift correction is able to produce a corrected matrix which allows the resolution of the free metal ion and the complex. Nevertheless, the concentration profiles obtained will not be totally reliable unless the change in the currents caused by complex dissociation is also taken into account. A rigorous solution for this problem is not easy, since it requires considering the dissociation kinetics of the complex. Alternatively, a reasonable improvement of the results could be obtained by assuming that, in intermediate situations between labile and inert behaviour, eqn (7) compensates the negative potential shift of the free metal signal due to dissociation with the corresponding current increase.⁴⁰ Such approximation, which produced acceptable results in the Cd(II)-NTA system,⁴⁰ can be used in two ways: (i) by applying eqn (7) directly to the peak potentials and currents measured for the signal of the free metal in the same way as for a totally labile system, and (ii) by modifying the signal heights of the free metal and the complex in the *shiftfit*-corrected matrix as a function of the observed potential shift and further applying MCR-ALS. For this purpose, let us assume that eqn (7) holds for both inert and quasi-inert situations. Then, it is possible to write:

$$\begin{aligned} & \exp \left\{ -\frac{nF}{RT} \Delta E_{M,\text{inert}} - \ln \left(\frac{I_{M,\text{inert}}}{I_0} \right) \right\} \\ & = \exp \left\{ -\frac{nF}{RT} \Delta E_M - \ln \left(\frac{I_M}{I_0} \right) \right\} \end{aligned} \quad (12)$$

where $\Delta E_{M,\text{inert}}$, ΔE_M , $I_{M,\text{inert}}$ and I_M are the potential shifts and the currents measured for the signal of the metal ion in the presence of the ligand in the inert and quasi-inert cases, respectively, and I_0 is the current measured for the metal ion in the absence of the ligand. If we consider that $\Delta E_{\text{inert}} = 0$, the equation above can be rearranged in the form:

$$I_{M,\text{inert}} = I_M \exp \left\{ \frac{nF}{RT} \Delta E \right\} \quad (13)$$

which can be used to correct the height of the signal of the free metal prior to MCR-ALS analysis.

Finally, it must be noted that some aspects of this method for the M/ML case can be extended to the situation of different successive complexes which (i) are all inert or (ii) some of them are inert and some of them are labile.

3. Experimental and data treatment

3.1. Chemicals and instrumentation

Glutathione (GSH), in the reduced form, was provided by Merck and glycine (Gly) by Sigma, both with a purity greater

than 99%. All other reagents used were Merck and Sigma analytical grade. Cd(II) and Zn(II) stock solutions were prepared by dissolving Cd(NO₃)₂·4H₂O and Zn(NO₃)₂·4H₂O in water and standardised complexometrically.⁴¹

Tris(hydroxymethyl)aminomethane-HNO₃ buffer solutions of pH 7.5 were used for pH control. Ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185, Millipore) was employed in all experiments.

Voltammetric measurements by differential pulse polarography (DPP) were carried out with a 757 VA Computrace (Metrohm). The working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.6 mm², Ag/AgCl/KCl (3 mol L⁻¹), and a glassy carbon electrode, respectively. Instrumental parameters were as follows: pulse amplitude of 0.05 V, pulse time of 0.04 s, drop time of 1 s; voltage step was 4 mV for the titrations of the Cd(II)-GSH system and 3 mV for the titrations of the Zn(II)-Gly system.

Experiments were performed at a controlled room temperature of 20 °C and under a purified N₂ atmosphere.

The measurements of pH values during the experiments were carried out by means of a Crison micropH2000 pH meter.

3.2. Procedures

For titrations of glutathione with cadmium, 20 mL of GSH (2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹) were placed into the cell and deaerated with nitrogen for 20 min. Then the DPP curve was recorded. After that, successive additions of 8 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ Cd(II)-ion solution were made. After each addition and deaeration for 1 min, voltammograms were recorded. The peptide solution was freshly prepared before each experiment by dissolving the peptide in a previously deaerated buffer solution. All solutions were prepared in 0.05 mol L⁻¹ of TRIS.

The experiments to study Zn(II)-glycinate stability constants were carried out placing 20 mL of 1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ Zn(II) solution into the cell and deaerated with nitrogen for 30 min. Then, several DPP curves were recorded each 5 min in order to make certain of the absence of adsorption onto the cell walls. After that, aliquots of 1.67 mol L⁻¹ glycine solution (0.01 mol L⁻¹ glycinate) were added and DPP curves recorded. Between additions, solutions were purged and mechanically stirred for 1 min. All solutions were freshly prepared in 0.05 mol L⁻¹ KNO₃/0.01 mol L⁻¹ TRIS.

3.3. Data simulation for a simple labile system

A preliminary test of the proposed method has been carried out on simulated data. The system considered was relatively simple: two successive labile metal complexes with stability constants log β₁ = 4.50 and log β₂ = 8.00 and with diffusion coefficients equal to that of the free metal ion. The individual signals were constructed according to the theoretical expression for the difference δ between the currents before and after the pulse application in differential pulse polarography (DPP):⁴²

$$\delta = \frac{nFAD^{1/2}c}{\pi^{1/2}t_p^{1/2}} \left[\frac{P_A(1-\sigma^2)}{(\sigma + P_A)(1 + P_A\sigma)} \right] \quad (14)$$

where:

$$P_A = \exp \left[\frac{nF}{RT} \left(E + \frac{\Delta E}{2} - E_{1/2} \right) \right] \quad (15)$$

$$\sigma = \exp \left(\frac{nF \Delta E}{RT \cdot 2} \right) \quad (16)$$

and where ΔE is the pulse amplitude (50 mV in the present simulation) and t_p is the pulse duration (50 ms). Simulated voltammograms were computed as the sum of two DPP peaks: one staying at a fixed potential and proportional to the ligand concentration and the other proportional to the total concentration of the metal and moving towards more negative potentials at increasing ligand concentrations according to eqn (8). Other parameters used in the simulation were: diffusion coefficient of all metal species $D = 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, total metal concentration $c_{\text{TM}} = 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, total ligand concentration c_{TL} ranging from 0 to $5 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, half-wave potentials ($E_{1/2}$) -0.55 and -0.70 V for the free metal and the ligand, respectively, $n = 2$ for both signals, and charge transfer coefficients $\alpha = 1$ for the metal (reversible reduction) and $\alpha = 0.4$ for the ligand (irreversible). It must be pointed out that for irreversible signals the n parameter in eqns (15) and (16) is replaced by the product αn . The electrode surface is set as $A = 1$, so that δ currents are given in arbitrary units. The proportionality factor for the ligand signal was 0.05 times that of the metal signal. Finally, different levels of Gaussian noise were added to the simulated current matrix.

3.4. Initial estimation of pure voltammograms using *peakmaker* function

Peakmaker is a home-made Matlab function²¹ that generates Gaussian peaks according to the equation:

$$y = a \exp \left[- \frac{(x-b)^2}{c} \right] \quad (17)$$

whose characteristic parameters (height a , position b and width c) are selected manually with the mouse by visual comparison to the data matrix (**I**). The peaks are then integrated into a matrix that can be used whether as a set of reference voltammograms (**V**₀) to be applied in *shiftfit* or as an initial estimation of the pure voltammograms (**V**) used to start the MCR-ALS iterations. The different steps of the procedure can be summarised as follows:

- (i) The program plots the data matrix **I** in a 2D graph (currents *versus* potentials).
- (ii) The user moves the cursor with the mouse to place it on the top of each maximum of the graph susceptible to be a component and then presses the mouse button. The program determines the height (parameter a) and the x -position (parameter b) of every peak, which are given by the y - and x -coordinates, respectively, of the cursor every time the button is pressed.
- (iii) With the **I** matrix still visible, the program draws one Gaussian peak at each position previously determined by the mouse with a default width (parameter $c = 10$).

(iv) By following the same order as in the graphical input, the program draws a horizontal line at half of the height of each peak. Then, the user selects, by comparison with the **I** matrix in the background, the left or right x -position at half of the peak height ($x_{1/2}$) and presses the button. Using this value, the program computes parameter c of the Gaussian peak in the form:

$$c = \frac{1}{\ln 2} (x_{1/2} - b)^2 \quad (18)$$

(v) All individual peaks are integrated into the **V** matrix.

The program also allows one to generate asymmetric peaks by selecting two different half-peak widths (right and left). Then, the peak is defined by a different Gaussian equation at each side of the maximum.

4. Results and discussion

4.1. Analysis of simulated data

Fig. 4 and Table 1 summarise the analysis of the data simulated as described in Section 3.3 by using the standard MCR-ALS procedure and by means of MCR-ALS with a previous potential shift correction. In the first case, four components have been used to describe the system: one for the metal ion, two for the successive complexes and one for the free ligand. As Table 1 shows, the lack of linearity of the system produces an excessive lof (10.3% in the case including 0.1% of Gaussian noise) and values of the stability constants somewhat lower (0.25 and 0.32 log units) to these applied in the simulation.

In contrast, the data previously corrected for potential shifts can be analysed by MCR-ALS considering two components only (free metal + metal complexes on one hand and free ligand on the other) and they produce better values of lof (4.38% in the same case as before). Table 1 shows that these values do not increase significantly when noise increases, which suggests that a large portion of noise is 'filtered' by the *shiftfit* program. Finally, the fitting of eqn (8) to the optimised ΔE values computed by *shiftfit* produces quite precise values for the stability constants which are very close to the values used for simulation (discrepancies between 0.01 and 0.10 log units).

It must be pointed out, however, that the lof of standard MCR-ALS (10.3% in the previous case) cannot be strictly compared to that obtained after a previous potential shift correction (4.38%), since this previous operation is also contributing to the final error (in the case considered, *shiftfit* produces a lof of 2.54%). A more realistic calculation should be done as indicated in Section 2.2. Anyway, the resulting overall lof in this case (3.25%) is still better than the value obtained using the standard MCR-ALS procedure.

4.2. The Cd(II)–GSH system

Fig. 5a shows the current data matrix obtained in the DPP titration of glutathione (GSH) with a Cd(II) solution at pH 7.5 in 0.05 mol L⁻¹ TRIS. As Cd(II) is being added, the initial anodic signal of GSH (signal 2 in Fig. 5) starts to decrease and new signals develop, which can be attributed to an inert

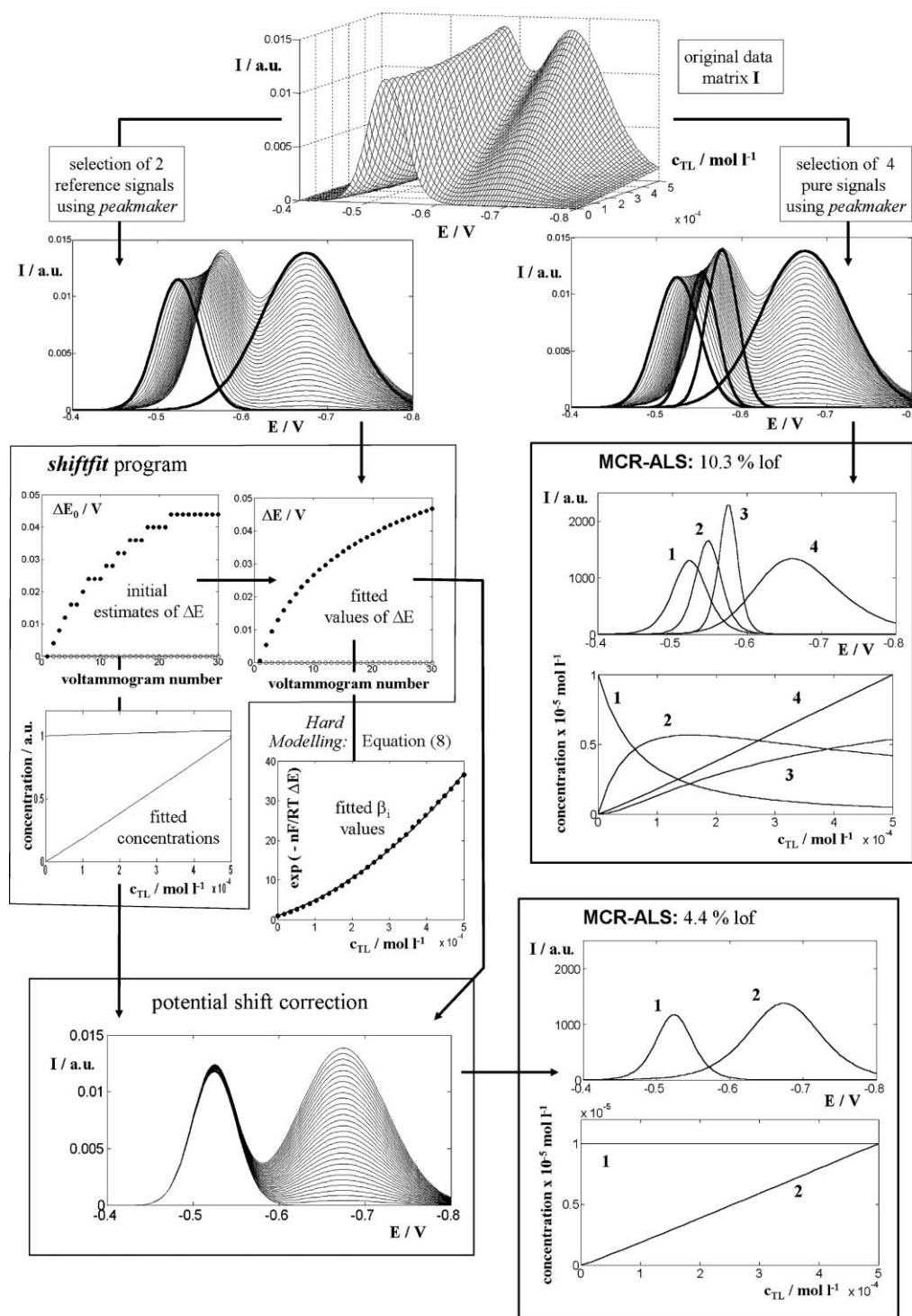


Fig. 4 Comparison of the standard MCR-ALS procedure and MCR-ALS with a preliminary potential shift correction (by means of the *shiftfit* program), when applied to signals simulated with a 0.1% of Gaussian error (expressed as the percentage of the standard deviation with respect to the maximum current of the matrix).

electroactive Cd(II)–GSH complex (signal 4) of 1 : 2 stoichiometry³⁴ and to an anodic signal of the mentioned complex (signal 1). Finally, at large enough concentrations of added cadmium, the peak of free Cd(II)-ion starts a fast increase (signal 3). A visual inspection of the experimental matrix evidences an important movement of signal 1, a very slight shift of signal 4 and no shift at all for signals 2 and 3.

This is consistent with the inert character of the complex, except for the slight movement of signal 4, which could be due to different reasons as, for instance, a decrease of the electrochemical reversibility of complex reduction. Anyway, the movement is so small that it can hardly affect the linearity of the system. A different question is the wide displacement of signal 1, which is likely to decrease linearity. Indeed, when

Table 1 Values of the stability constants $\log \beta_1$ and $\log \beta_2$ fitted by means of eqn (8) to the ΔE values obtained by applying the *shiftfit* program to simulated signals with different levels of Gaussian noise (expressed as the percentage of the standard deviation with respect to the maximum current of the matrix). The values used for simulation were $\log \beta_1 = 4.50$ and $\log \beta_2 = 8.00$ for a total metal concentration 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ and a ligand concentration ranging from 0 to 5×10^{-4} mol L $^{-1}$. The errors obtained in the application of *shiftfit* and MCR-ALS programs [expressed as the percentage of lack of fit, according to eqn (6)] are also indicated. The standard deviations of the fitted $\log \beta$ values have been computed as described in pages 372–374 of ref. 22 and are denoted with parentheses

Method	% noise	% lof <i>shiftfit</i>	% lof MCR-ALS	% lof overall	$\log \beta_1$	$\log \beta_2$
Standard MCR-ALS Non-negativity, signal shape and equilibrium constraints	0.1	—	10.3	10.3	4.25 (0.02)	7.68 (0.02)
Potential shift correction and MCR-ALS Non-negativity, signal shape and closure for metal species	0	2.53	4.38	3.24	4.492 (0.007)	7.912 (0.007)
	0.1	2.54	4.38	3.25	4.491 (0.007)	7.912 (0.007)
	0.5	2.79	4.38	3.45	4.484 (0.007)	7.917 (0.006)
	1	3.43	4.40	4.03	4.48 (0.01)	7.91 (0.01)
	2	5.30	4.44	5.66	4.53 (0.01)	7.90 (0.01)
	5	17.9	4.71	18.1	4.42 (0.05)	7.97 (0.04)

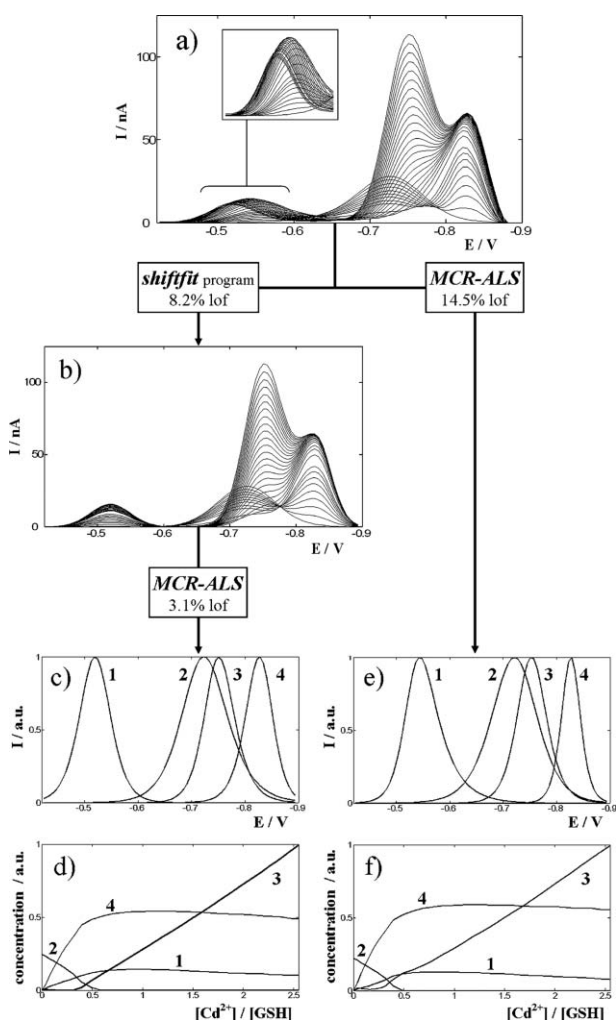


Fig. 5 Analysis of the experimental data matrix (a) containing the differential pulse polarograms measured for a GSH solution 2×10^{-5} mol L $^{-1}$ titrated with Cd(II) at pH 7.5 in a medium 0.05 mol L $^{-1}$ in TRIS buffer. The application of the *shiftfit* program produces a corrected matrix (b) that is analysed by MCR-ALS with the constraints of non-negativity and signal shape to obtain pure signals (c) and concentration profiles (d). The results obtained by direct MCR-ALS analysis of the experimental matrix using the same constraints (plus selectivity for signal 1) are also shown (e,f). The inset in (a) shows a magnification of the region where signal 1 is moving. The lack of fit of every operation is also indicated.

standard MCR-ALS is applied with four components (Fig. 5e,f) a too large lof is observed (14.5%), as well as a certain ambiguity of the signals along the iterations which required the use of selectivity constraints. The successive application of *shiftfit*, to correct the movement of signal 1, and MCR-ALS for the analysis of the corrected matrix (Fig. 5b–d) improve the lof considerably (8.2 and 3.1% respectively). Fig. 6 shows the good reproduction of the experimental matrix by both consecutive procedures (*i.e.* as the product \mathbf{CV}^T of the matrices obtained by MCR-ALS shifted by the *shiftcalc* program by using the optimal ΔE values). The overall lof (9.3%) is slightly higher than that of *shiftfit* and is still much better than that of conventional MCR-ALS.

At this point, it is interesting to notice that the corrected matrix (Fig. 5b) does not present the slight movement of component 4, even when we have not forced the *shiftfit* program to correct it. This is an intrinsic characteristic of the method: as all compounds have to be reproduced in the form $\mathbf{C}_k \mathbf{V}_{0,k}^T$ (see Fig. 3), all of them will remain at a fixed potential, independently of their movements. The main difference, however, between the forced and unforced movement correction is that the former optimises a ΔE value, so that in the reproduced matrix (to be compared to the experimental one in the lof) ΔE values recover the movement and the reproduction is good, whereas the latter yields $\Delta E = 0$, so that the movement is not reproduced and the lof increases. These statements are confirmed when *shiftfit* is required for simultaneously moving components 1 and 4 and MCR-ALS is applied to the corrected matrix. Then, the overall lof changes from 9.3% (only signal 1 corrected) to 8.1% (signals 1 and 4 corrected). Such decrease evidences a small contribution of signal 4 to non-linearity that, anyway, is not large enough to justify the correction of their small potential shifts.

Finally, the ΔE values obtained by means of *shiftfit* do not require a further treatment, since the most important information concerning to anodic signal 1 is the evolution of the concentration profile, which is very similar to that of the complex, thus reinforcing the consistency of the data. At this point it must be noted that an alternative solution for the movement of signal 1 would be cutting off the initial part of the matrix (*ca.* until -0.65 V) in order to remove component 1. This option, however, does not allow the calculation of a valuable concentration profile (that of signal 1) which confirms

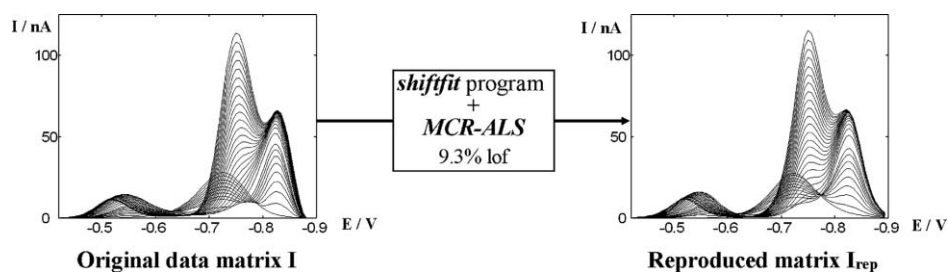


Fig. 6 Comparison of the original and reproduced data matrices after the overall process of *shiftfit* and MCR-ALS in the case of the voltammograms shown in Fig. 5.

the nature and evolution of component 4. In situations where the moving signal was more strongly overlapped, an effective cutting would be simply impossible.

4.3. The Zn(II)–glycine system

The Zn(II)–glycine system has been studied at pH 7.5 in 0.05 mol L⁻¹ KNO₃ and 0.01 mol L⁻¹ TRIS in the glycinate concentration range 0–1.8 × 10⁻⁴ mol L⁻¹. The concentration of deprotonated ligand (glycinate) has been computed using the acidity constants pK₁ = 2.36 and pK₂ = 9.57.^{43,44} The same literature provides values for the Zn(II)–glycinate stability constants (Table 2) which ensure that, under the experimental conditions of the present work, only ML and ML₂ complexes are expected.

As Fig. 7a shows, the addition of glycinate causes both a progressive decrease and a shift to negative potentials of the peak of the free metal ion. Additionally, there is a small peak increasing and further decreasing at ca. -1.15 V and a third one monotonically increasing at ca. -1.27 V.

From a qualitative point of view, this can be explained by assuming that both ML and ML₂ complexes are electroactive and partially inert. The first signal is decreased because, as the ligand is being added, an increasing fraction of the free metal ions initially present are reduced in the form of ML (second signal) or ML₂ (third signal) complexes. If the complexes were totally inert, the first signal would remain at the same potential

and the system would be linear from a chemometrical point of view. Thus, the observed progressive shift due to the partial dissociation of both complexes can introduce in the system an important source of non-linearity. In Section 2.4.5 an approximation is proposed to compensate potential shifts and current decreases due to partial complex dissociation in order to apply the DeFord–Hume method [eqn (7)] in these circumstances.

To check the suitability of such approximation, the data matrix in Fig. 7a has been analysed in two ways: (i) by means of MCR-ALS with non-negativity, signal shape and equilibrium constraints; and (ii) by fitting eqn (7) to the ΔE and current decrease values obtained by applying the *shiftfit* program to the experimental data matrix. The results of both methodologies are summarised in Table 2 and Fig. 7.

It can be seen that an appropriate choice of the reference signals (Fig. 7b) produces a set of potential shifts and current decreases (Fig. 7e) with a good reproduction of the original data matrix (Fig. 7d), confirmed by a reasonable lof (6.7%). The application of eqn (12) leads to an F_0 function (Fig. 7f) that allows the fitting of eqn (7) to yield the log β values which appear in Table 2. In contrast, the application of MCR-ALS (Fig. 7g,h) produces quite unrealistic pure signals, especially that of ML₂, which appears at ca. 0.1 V less negative potentials than the third signal in the data matrix. This results in a too high lof (15.7%) and in a set of stability constants notoriously lower than these obtained by using *shiftfit* (Table 2). If the

Table 2 Values of the stability constants log β_1 and log β_2 obtained for the Zn(II)–glycine system [Zn(II) 1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹, 0.05 mol L⁻¹ KNO₃ + 0.01 TRIS buffer pH = 7.5] by means of: (i) the application of MCR-ALS with non-negativity, signal shape and equilibrium constraints; and (ii) the fitting of eqn (7) to the ΔE and current decrease values obtained by applying the *shiftfit* program to the experimental data matrix. The errors obtained in the application of *shiftfit* and MCR-ALS programs [expressed as the percentage of lack of fit, according to eqn (6)] are also indicated. The standard deviations of the fitted log β values have been computed as described in pages 372–374 of ref. 22 and are denoted with parentheses. The values are compared to some literature data^{43,44} determined under similar conditions

Experimental technique	Experimental conditions	Additional information	% lof	log β_1	log β_2	Ref.
DPP	20 °C 0.05 M KNO ₃ –0.01 M TRIS	Standard MCR-ALS Non-negativity, signal shape and equilibrium constraints	15.7	4.78 (0.03)	8.94 (0.03)	This work
DPP	20 °C 0.05 M KNO ₃ –0.01 M TRIS	Shiftfit program	6.7	5.2 (0.1)	9.88 (0.02)	This work
Calorimetry	25 °C 0.05 M KCl	IUPAC tentative values	—	5.06	9.44	43
Glass electrode	25 °C 0.15 M KCl	IUPAC recommended values	—	5.03	9.23	
Glass electrode	25 °C 0.1 M ionic strength	—	—	4.96 ± 0.01	9.19 ± 0.1	44
Glass electrode	25 °C 0 M, ionic strength	—	—	5.38 ± 0.1	9.81 ± 0.2	

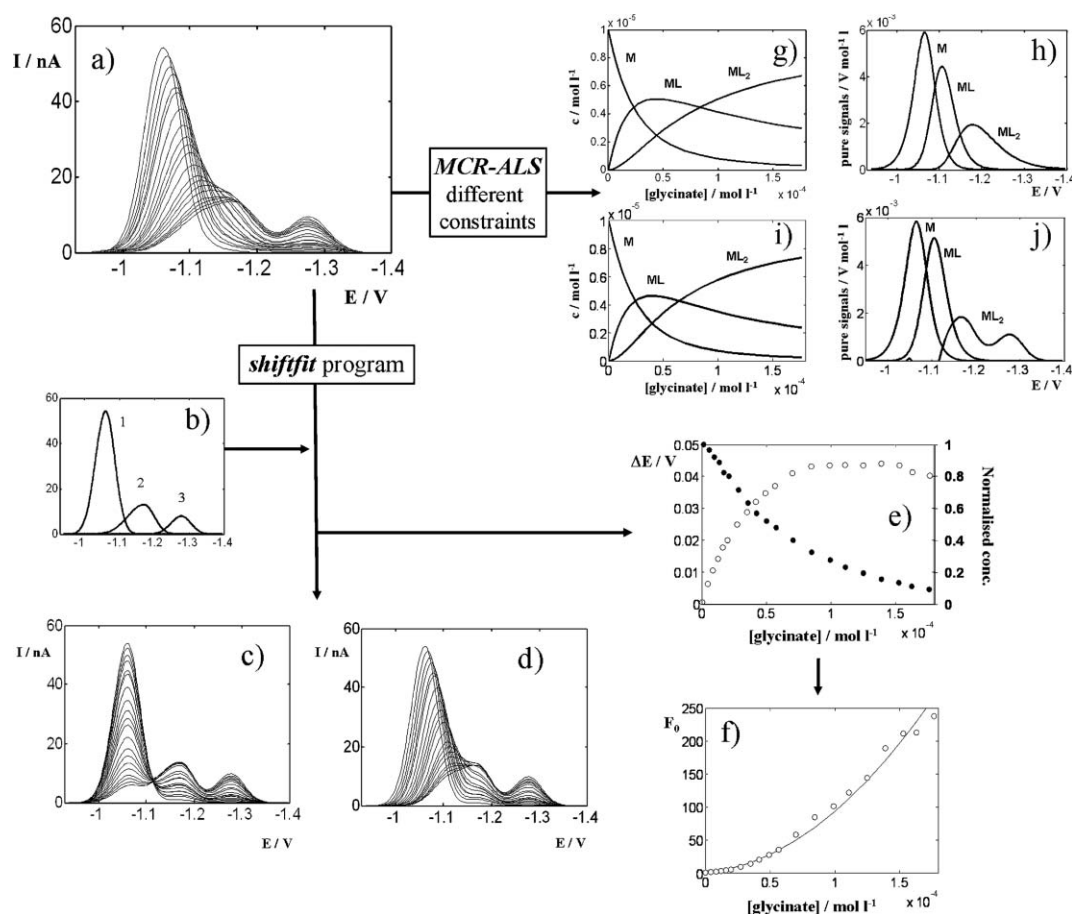


Fig. 7 Analysis of the experimental data matrix (a) containing the differential pulse polarograms measured for a Zn(II) solution $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ titrated with glycine at pH 7.5 in a medium 0.05 mol L^{-1} in KNO_3 and 0.01 mol L^{-1} in TRIS buffer. The application of the *shiftfit* program using the reference signals shown in (b) produces the reproduced matrix (d), the corrected matrix (c) and a series of potential shifts ΔE and concentration/current decreases (e) which are integrated into the Leden F_0 function (f), which can be fitted to eqn (7) to yield a curve (denoted with a solid line) and the stability constants summarised in Table 2. The application of MCR-ALS with non-negativity, signal shape and equilibrium constraints for all three components allows one to obtain concentration profiles (g) and pure signals (h) for M, ML and ML_2 , as well as the fitted values of the stability constants shown in Table 2. Fig. 7i,j show the results obtained when the signal shape constraint is applied only to the species M and ML.

signal shape constraint is only applied to M and ML, the lof improves slightly (10.5%), similar concentration profiles are obtained (Fig. 7i) and the signal of ML_2 is split into two parts to explain the dissociated and undissociated fractions of the complex (Fig. 7j). As compared to literature data, the values obtained by MCR-ALS are lower and these from *shiftfit* are higher but somewhat closer to them, especially considering literature data at the lowest ionic strengths (0 and 0.05). These facts confirm a significant improvement of the MCR-ALS data analysis when using the *shiftfit* approach.

5. Conclusions

In voltammetric techniques, the relationship between the kinetics of chemical/electrochemical reactions and the time window of the measurement can dramatically affect the linearity of the data. For fast enough techniques, systems become inert and signals usually appear at the same potential, which ensures data linearity and allows a successful application of MCR-ALS. In contrast, slower techniques or faster kinetics produce signals which in fact average contributions of

species that are converting into each other during the measurement time. This usually produces signals moving along the potential axis in intermediate positions between the pure signals of the interconverting species. Also, the change in the measurement speed and/or in the experimental conditions (e.g. pH, ionic strength...) can modify the kinetics of electrochemical reductions, which can produce a potential shift and occasionally a broadening of the reduction signals. These facts cause a decrease of linearity which, depending on the magnitude of the potential shift, can still be afforded by MCR-ALS or, in many cases, hinders MCR-ALS analysis (too large lof values are registered unless an unrealistically high number of components is used to explain non-linearity).

For non-overlapping signals, electrochemical *hard modelling* provides a wide variety of methods for the study of labile or kinetically-governed systems. However, they are based on peak (or half-wave) potentials, peak (or limiting) currents or even on the full signal shape, but in all cases free of overlapping with other signals. The potential shift correction method by means of the *shiftfit* program allows one to virtually extract the non-linearity of the data in the form of a potential shift matrix

that can be further analysed by *hard modelling* as in the case of non-overlapping signals. Moreover, *shiftfit* produces a corrected, linear matrix that can be easily analysed by MCR-ALS. Indeed, the proposed method is a combination of *soft-* and *hard-modelling* approaches which takes advantages from different aspects of both strategies.

In the present work, the analysis of simulated and experimental data has shown the reliability of the potential shift method in some of the situations described in the theoretical formulation, mostly those concerning non-negligible complex dissociation or the presence of moving anodic signals caused by the ligand. The results of such studies, as well as some preliminary tests made in more complex systems, allow us to summarise some general considerations about the proposed method:

- In the potential shift correction, an appropriate selection of the reference signals is critical: small variation in that can seriously increase the lof. For this purpose, signals of the isolated species (*e.g.* free metal ion) can be used or, if not available, the *peakmaker* program or the SIMPLISMA method can be applied.

- All moving signals should be corrected simultaneously: *shiftfit* is based on reproducing all non-moving signals as a product of C-like and V-like matrices, so that a remaining moving signal would not be properly reproduced and this can generate a large error in the computation of the corrected matrix that cannot be further corrected by a new application of *shiftfit*.

- The position of the reference signal of the moving peak is totally arbitrary and does not affect the performance of *shiftfit*. It just states the origin from which all ΔE values are measured.

- From a data matrix containing a set of moving signals, *shiftfit* can usually provide a matrix of potential shifts and a linear corrected matrix. However, the use of that corrected matrix only will be reliable as far as there is an electrochemical explanation for the existence of such potential shift. Otherwise, *shiftfit* could introduce artifacts in the data analysis. In some cases, the explanation also makes possible the calculation of significant parameters by *hard modelling*.

- The use of *shiftfit* may require the integration of different species in a single component.

- The proposed method can only linearise data if the moving signals maintain their shape along the whole experiment. A change in the shape of a unit voltammogram (typically, the broadening caused by a progressive decrease of electrochemical reversibility) causes a dramatic increase of non-linearity that cannot be corrected by *shiftfit*.

At present, additional work is being carried out in our research group to apply the proposed method to experimental systems representative of other situations mentioned in Section 2.4. If these studies are successful, *shiftfit* could become a very useful tool to extend chemometrical applications to many electrochemical systems that by now are practically forbidden or restricted to ANN or PLS with an unrealistically high number of latent variables. Furthermore, it would be interesting to test the applicability of the algorithm to other linearity-based chemometrical methods like the already mentioned PLS for multivariate calibration or other multivariate curve resolution methods like Iterative Target Transformation

Factor Analysis (ITTFA), which has many similarities to MCR-ALS and has already been applied to electrochemical systems.⁴⁵⁻⁴⁷ It would also be desirable to test the method with data obtained with other experimental techniques (*e.g.* spectroscopic ones) but equally affected by signal movement along *x*-axis.

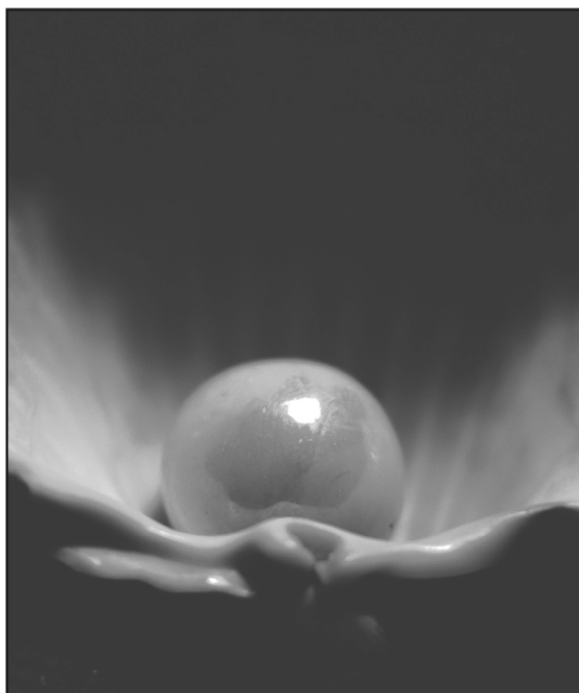
Acknowledgements

The authors acknowledge support of the Spanish Ministry of Education and Science (Project CTQ2006-14385-C02-01/BQU) and from the *Generalitat* of Catalonia (project 2005SGR00186).

References

- 1 S. D. Brown and R. S. Bear, Jr., *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1993, **24**, 99 and refs cited therein.
- 2 E. Richards, C. Bessant and S. Saini, *Electroanalysis*, 2002, **14**, 1533 and refs cited therein.
- 3 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 86 and refs cited therein.
- 4 R. I. Stefan, J. F. van Staden and H. Y. Aboul-Enein, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 1999, **29**, 133 and refs cited therein.
- 5 V. Pravdová, M. Pravda and G. G. Guilbault, *Anal. Lett.*, 2002, **35**, 2389.
- 6 R. Tauler, A. Smilde and B. R. Kowalski, *J. Chemom.*, 1995, **9**, 31.
- 7 J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B. S. Grabaric, M. Esteban and E. Casassas, *J. Electroanal. Chem.*, 1995, **393**, 7.
- 8 M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz and R. Tauler, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 49.
- 9 J. H. Christensen, G. Tomasi and A. B. Hansen, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 255.
- 10 A. M. van Nederkassel, M. Daszykowski, P. H. C. Eilers and Y. vander Heyden, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1118**, 199.
- 11 W. Yao, X. Yin and Y. Hu, *J. Chromatogr., A*, 2007, **1160**, 254.
- 12 S. F. Moller and B. M. Jorgensen, *J. Chromatogr. Sci.*, 2007, **45**, 169.
- 13 V. Pravdová, B. Walczak and D. L. Massart, *Anal. Chim. Acta*, 2002, **456**, 77.
- 14 E. Szymańska, M. J. Markuszewski, X. Capron, A. M. van Nederkassel, Y. vander Heyden, M. Markuszewski, K. Krajka and R. Kaliszan, *Electrophoresis*, 2007, **28**, 2861.
- 15 J. Forshed, I. Schuppe-Koistinen and S. P. Jacobsson, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **487**, 189.
- 16 J. Forshed, R. J. O. Torgrip, K. M. Åberg, B. Kalberg, J. Lindberg and S. P. Jacobsson, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2005, **38**, 824.
- 17 J. Jaumot, M. Vives, R. Gargallo and R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, 2003, **490**, 253.
- 18 D. R. Crow, *Polarography of Metal Complexes*, Academic Press, London, 1969.
- 19 W. Windig and J. Guilment, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1425.
- 20 W. Windig and S. Markel, *J. Mol. Struct.*, 1993, **292**, 161.
- 21 M. J. López, C. Ariño, S. Díaz-Cruz, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler and M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 2003, **37**, 5609.
- 22 J. M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban and R. Tauler, *Analyst*, 2001, **126**, 371.
- 23 *Matlab* version 7.3.0.267, Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 2006.
- 24 A. Savitzky and M. J. E. Golay, *Anal. Chem.*, 1964, **36**, 1627.
- 25 T. F. Coleman and Y. Li, *SIAM J. Optimization*, 1996, **6**, 418.
- 26 T. F. Coleman and Y. Li, *Math. Program.*, 1994, **67**, 189.
- 27 K. Levenberg, *Q. Appl. Math.*, 1944, **2**, 164.
- 28 D. Marquardt, *SIAM J. Appl. Math.*, 1963, **11**, 431.
- 29 D. D. DeFord and D. N. Hume, *J. Am. Chem. Soc.*, 1951, **73**, 5321.
- 30 M. Fernández, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **505**, 44.
- 31 H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen and K. Holub, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **234**, 1.

- 32 H. G. de Jong and H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **234**, 17.
- 33 H. G. de Jong and H. P. van Leeuwen, *J. Electroanal. Chem.*, 1987, **235**, 1.
- 34 M. S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler and M. Esteban, *J. Inorg. Biochem.*, 1997, **66**, 29.
- 35 J. Heyrovsky and J. Kuta, *Principles of Polarography*, Academic Press, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences, New York, Prague, 1966, p. 161.
- 36 J. Koryta, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1959, **24**, 3057.
- 37 N. E. Schmidt, E. E. Mercer and R. H. Philp, Jr., *J. Electroanal. Chem.*, 1993, **359**, 115.
- 38 M. M. Correia dos Santos, M. L. Simões Gonçalves and J. C. Romão, *J. Electroanal. Chem.*, 1996, **413**, 97.
- 39 M. Torres, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, B. S. Grabaric, R. Tauler and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 1998, **371**, 23.
- 40 M. Torres, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, B. S. Grabaric and M. Esteban, *Electroanalysis*, 1999, **2**, 93.
- 41 A. I. Vogel, *Textbook of Quantitative Chemical Analysis*, Longman, London, 5th edn, 1989.
- 42 A. M. Bond, *Modern Polarographic Methods*, M. Dekker, New York, 1980, p. 249.
- 43 IUPAC Stability Constants Database, v. 5.16, Academic Software, 2001.
- 44 A. M. Martell and R. M. Smith, *Critical Stability Constants: Amino Acids v. 1*, Plenum Press, New York, 1974.
- 45 Y. Ni, S. Kokot, M. Selby and M. Hodgkinson, *Anal. Chim. Acta*, 1995, **316**, 233.
- 46 Y. Ni and L. Jin, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1999, **45**, 105.
- 47 U. Evans, O. Soyemi, M. S. Doescher, U. H. F. Bunz, L. Kloppenburg and M. L. Myrick, *Analyst*, 2001, **126**, 508.



Looking for that **Special**
research paper from applied
and technological aspects of the
chemical sciences?

TRY this free news service:

Chemical Technology

- highlights of newsworthy and significant advances in chemical technology from across RSC journals
- free online access
- updated daily
- free access to the original research paper from every online article
- also available as a free print supplement in selected RSC journals.*

*A separately issued print subscription is also available.

Registered Charity Number: 207890

RSCPublishing

www.rsc.org/chemicaltechnology

11.4 Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: Influence of concentration range and deposition parameters

N. Serrano, A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban

Electrochimica Acta 53 (2008) 6616-6622

Dado el creciente interés por la utilización de electrodos de trabajo basados en materiales menos tóxicos que el mercurio, y la posibilidad de que este material no origine señales anódicas, se decidió ensayar la complejación de los sistemas ligando/Pb(II) utilizando un electrodo de película de bismuto (BiFE).

Como electroquímicos, quisiéramos comentar aquí que la disposición a rechazar el mercurio incluso en los laboratorios de investigación no responde a un peligro efectivo - tanto para las personas como para el medio ambiente- si se toman las medidas necesarias de prevención. Además, la peligrosidad del mercurio resulta muy diferente según su especiación (por ejemplo, el mercurio metálico es mucho menos dañino que sus compuestos organometálicos), aunque es verdad que la acción de las bacterias sulfatorreductoras convierte unas especies en otras durante el ciclo biogeoquímico de este elemento [7]. Actualmente, la Unión Europea regula el empleo y ámbito de aplicación del mercurio a fin de reducir de forma drástica sus emisiones [8], y el SOCOPSE (Source control of priority substances in Europe) asegura que dicha legislación no afectará al trabajo de laboratorio en un futuro próximo, si bien la tendencia es a disminuir su uso [9].

Así pues, aparte de acogerse a las ideas sobre la protección medioambiental (de por sí importantes), el uso del BiFE responde a la expectativa de la ausencia de señales anódicas en un medio que contenga grupos funcionales sulfhidrilo o, de existir, que su solapamiento con las señales del metal libre y los complejos sea menor, con la consiguiente simplificación del análisis quimiométrico de las matrices voltamperométricas. La elección del electrodo de película de bismuto se hizo en base a su baja toxicidad y a su comportamiento electroquímico, similar al del mercurio [10].

El presente artículo queda un tanto alejado de la idea central de la tesis, pues no recoge ningún experimento de complejación e incluso las técnicas utilizadas, DPASV y CCSCP, no son las habituales para registrar las valoraciones complexométricas. Sin embargo, sirve como una primera aproximación al electrodo de película de bismuto (que no se había utilizado en el grupo de Electroanálisis), toda vez que se estudia el desdoblamiento que sufren algunas señales de metales en este electrodo, cuestión que necesita ser aclarada previamente a la complejación, pues las publicaciones aparecidas hasta entonces no abordan los intervalos de concentración donde se produce dicho fenómeno, desconociéndose el auténtico intervalo de linealidad de los metales en BiFE.

El hecho de utilizar técnicas de redisolución responde a su mayor conveniencia para conocer las causas del desdoblamiento (implican una etapa de preconcentración y otra de reoxidación), y las conclusiones a las que se llegan pueden resultar valiosas para comprender el comportamiento electroquímico de los metales en DPV, la técnica habitual utilizada en esta tesis para los estudios de complejación.



Signal splitting in the stripping analysis of heavy metals using bismuth film electrodes: Influence of concentration range and deposition parameters

Núria Serrano, Arístides Alberich, José Manuel Díaz-Cruz*, Cristina Ariño, 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 12 March 2008

Received in revised form 17 April 2008

Accepted 18 April 2008

Available online 26 April 2008

Keywords:

Stripping chronopotentiometry (SCP)

Anodic stripping voltammetry (ASV)

Bismuth film electrode (BiFE)

Signal splitting

Multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS)

ABSTRACT

The stripping signals of Pb(II), Cd(II) and Zn(II) in a bismuth film electrode (BiFE) *ex situ* plated on glassy carbon support were studied by differential pulse anodic stripping voltammetry and constant-current stripping chronopotentiometry. Regular signals were measured for Pb(II), with a good linearity inside a wide concentration range. In contrast, Cd(II) and Zn(II) produce two overlapping signals, one predominating at low metal concentrations and the other at high metal concentrations. For the detailed study of such peak splitting, multivariate curve resolution by alternating least squares has been used concluding that the total area becomes linear with metal concentration in both situations. The reasons of the peak splitting seem to be related to the accumulation of the reduced metal on BiFE in different ways. Even with that complication, the fact that the linear relationship total area *versus* concentration is hold reinforces the applicability of BiFE for the determination of total concentrations of metal ions inside a wider concentration range than that initially expected. However, the coexistence of signals at different characteristic potentials anticipates important difficulties in the analysis of potential shifts caused by heavy metal complexation.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since pioneering work of Heyrovský [1], mercury electrodes have become the most widely used for electroanalytical purposes. The dropping mercury (DME), the static and the hanging mercury drop (SMDE and HMDE) and the mercury film (MFE) electrodes have been successfully applied to the determination of many inorganic and organic substances [2], due to its wide cathodic range. However, its high potential toxicity is an important disadvantage. Indeed, some recent European Regulations on the banning of exports and safe storage of metallic mercury makes necessary to develop alternative electrode materials that exhibit an analogous electrochemical behaviour but lower toxicity.

Many alternative electrodes, based on non-toxic solid amalgams [3], chemically modified surfaces [4] and different bare carbon, gold or iridium, have been tested [5–8]. The ideal electrode should provide an extensive cathodic potential range, a reproducible response as well as a high signal-to-noise ratio, and these are not common features for electrodes made with other materials than mercury [2].

Bismuth is considered among the less toxic metals and poses minimum threat to the environment. Some recent studies have tested the application of bismuth film electrodes (BiFE) for anodic stripping voltammetry (ASV) [9–12], a technique that has proved to be useful for the analysis and speciation of heavy metal ions in environmental and biological samples [5,13]. Recently, constant-current stripping chronopotentiometry (CCSCP) has shown to be a valuable alternative to ASV [14], but application of CCSCP with BiFE has been relatively scarce [15–17].

In a previous paper [18] effects of electroplating variables on the ASV responses of Pb(II) and Zn(II) at BiFE were investigated. For Zn(II) the signal consisted of two overlapped peaks of different heights, showing a complex behaviour that requires further studies.

In the present work, both ASV and SCP are used to study the concentration ranges of Cd(II), Pb(II) and Zn(II) in which *ex situ*-prepared BiFE behaves similarly to mercury electrodes. This is especially important when evaluating stoichiometries and stability constants of metal complexes with ligands of biological or environmental interest. In these cases, it is essential to ensure a wide linear range between currents and metal concentrations so that a wide metal-to-ligand ratio range can be accurately studied. By other hand, it is crucial to test the accuracy of potential measurements, since most methods of stability constant determination are based on the potential shifts caused by complexation.

* Corresponding author. Tel.: +34 93 403 91 16; fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: josemanuel.diaz@ub.edu (J.M. Diaz-Cruz).

2. Experimental

2.1. Chemicals

A standard Bi(III) solution ($996 \mu\text{g mL}^{-1}$, atomic absorption standard solution) was purchased from Aldrich. All other reagents used were Merck analytical grade. Cd(II), Pb(II) and Zn(II) stock solutions ($10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$) were prepared from $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ and $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, respectively and standardized complexometrically. Acetate buffer solution 0.2 mol L^{-1} (pH 4.5) 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 electrochemical parameters

Differential pulse anodic stripping voltammetry (DPASV) and CCSCP 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 system was also connected to a Metrohm 665 Dosimat for the addition of solutions.

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

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

The working electrode used was a bismuth film coated glassy carbon electrode (BiFE) prepared from a glassy carbon disk electrode of 2 mm diameter (Metrohm, Switzerland).

Unless otherwise indicated, pulse time of 40 ms, step potential of 2 mV and pulse amplitude of 50 mV were applied in DPASV. In both CCSCP and DPASV a deposition potential (E_d) was applied along 60 s unless otherwise indicated and a rest period of 5 s was performed between the deposition and the stripping steps. The usual rotating speed of BiFE-RDE was 1500 rpm.

2.3. Ex situ preparation of the bismuth film on the BiFE-RDE

The glassy carbon (GC) disk electrode was polished using a suspension of alumina particles of 300 nm diameter. Then, GC, 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, $E_d = -0.60 \text{ V}$ was applied for 300 s with a RDE rotation speed of 500 rpm, followed by a rest period (without rotation) of 20 s. Once the bismuth film is deposited, the three electrodes were rinsed with water and the Bi(III) solution is replaced in the cell by the one to be measured.

This procedure, which partially modifies a previous one [11], has been proposed from an exhaustive testing of different deposition times and Bi(III) concentrations. Although the optimal values of such parameters are somewhat high in comparison with the usual conditions in the literature, they have proven to produce Bi films with a high repetitivity (R.S.D. = 2.5%) and a noticeable reproducibility (R.S.D. = 10.2%).

2.4. Stripping voltammetric and chronopotentiometric measurements

Each titration started by placing in the cell 25 mL of the $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ solution. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 15 min and a blank scan was recorded. Further,

aliquots of Cd(II), Pb(II) or Zn(II) solution were added and the respective curves were recorded. All solutions were deaerated and mechanically stirred for 1 min after each addition. In order to prevent changes in ionic strength, the solution to be added contained $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. By operating under these conditions a wide range of working potentials was attained, which allowed us to obtain well-defined signals for all these metals ions.

2.5. Data treatment

The multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS) analysis of electrochemical data obtained by any kind of mercury electrode has been summarized elsewhere [19,20], including a discussion of its applicability in the case of dt/dE signals obtained in SCP measurements [21]. The different steps of MCR-ALS method are followed in the analysis of experiments carried out with BiFE, once the linear contribution of all components to the overall signal is confirmed. Thus, voltammograms are smoothed, baseline-corrected, and converted in a data matrix **I** by means of some homemade Matlab programs [22]. Then, the number of components is evaluated by singular value decomposition (SVD) as the mathematical factors contributing linearly to the signal. It is important to remark that when MCR-ALS is applied to electrochemical data, the concept of "component" is interpreted as an electrochemical process giving a specific signal, in contrast with

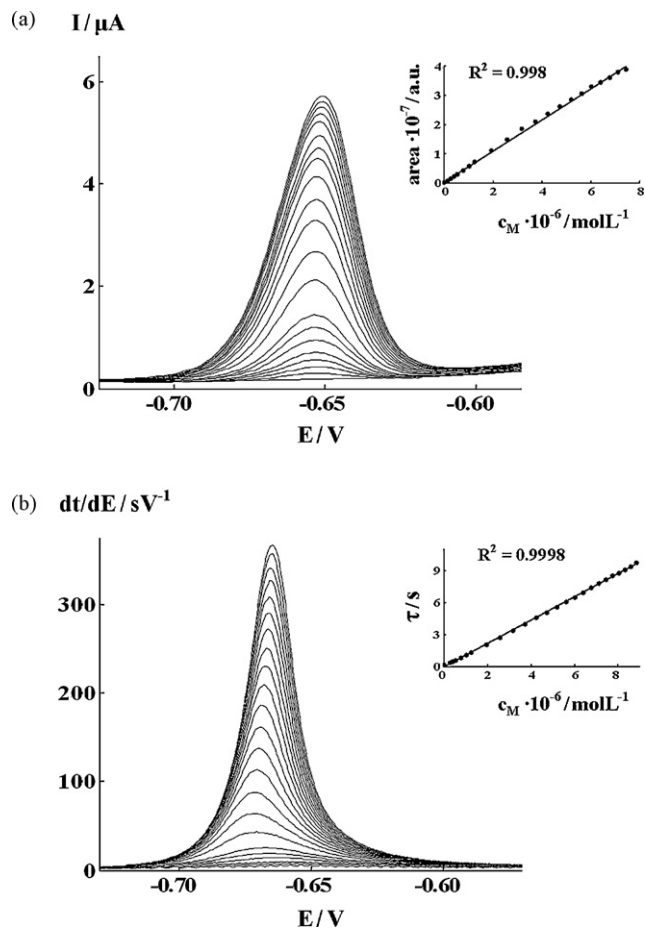


Fig. 1. Series of voltammograms (a) and chronopotentiograms at $I_{ox} = 10^{-6} \text{ A}$ (b) obtained for increasing concentrations of Pb(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ on BiFE, using a deposition potential of -0.80 V , a deposition time of 60 s, a rest time of 5 s, and a rotation speed during the stripping step of 1500 rpm. The resulting calibration plots are also shown (inset).

the spectroscopic data interpretation in which components are the chemical species [19,20,23]. This is particularly evident in this work, where a unique chemical species – even a unique nominal electrochemical process – can present more than one signal, since other thermodynamic and kinetic aspects of the redox processes onto the BiFE surface must be taken into account. Finally, the matrix \mathbf{I} is factorised as a product of a matrix \mathbf{C} (containing the concentration profiles of every component) and a matrix \mathbf{V}^T (containing the corresponding pure voltammograms) plus a matrix \mathbf{X} expressing the relative error of the process: $\mathbf{I} = \mathbf{C}\mathbf{V}^T + \mathbf{X}$. This decomposition is carried out in an iterative way from an initial estimation of pure signals (built with a homemade subroutine named *peak-maker* implemented in Matlab [24]) and applying some restrictions (constraints) that ensure a physico-chemical meaning to the mathematical solution.

3. Results and discussions

3.1. Stripping voltammetric and chronopotentiometric measurements of Pb(II)

Series of voltammograms and chronopotentiograms for increasing concentrations of Pb(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ were measured using $E_d = -0.80 \text{ V}$. CCSCP measurements were carried out using two different oxidation currents (I_{ox}), 10^{-6} A (high current) and

10^{-8} A (low current), although it has been shown that in film electrodes the total depletion regime (the most convenient for analytical purposes) predominates in a wide range of oxidation currents [25].

Fig. 1 shows the experimental stripping voltammetric (a) and chronopotentiometric (b) signals for successive concentration increments of Pb(II). A unique stripping peak was observed by both techniques, and a linear response of the peak area versus Pb(II) concentration was observed over the range 1×10^{-7} to $9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. At higher concentrations linearity decreased, surely as a consequence of electrode saturation.

3.2. Stripping voltammetric and chronopotentiometric measurements of Cd(II)

Stripping voltammograms and chronopotentiograms for increasing concentrations of Cd(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ were measured using $E_d = -0.95 \text{ V}$, and $I_{ox} = 10^{-6} \text{ A}$ for CCSCP.

Fig. 2a shows the evolution of DPASV signals when the concentration of Cd(II) increases. At low concentrations, a stripping peak at -0.83 V was observed, but after some Cd(II) additions a shoulder appears at more negative potential. This shoulder is developed into a new overlapping peak at ca. -0.87 V which increases gradually with Cd(II) concentration.

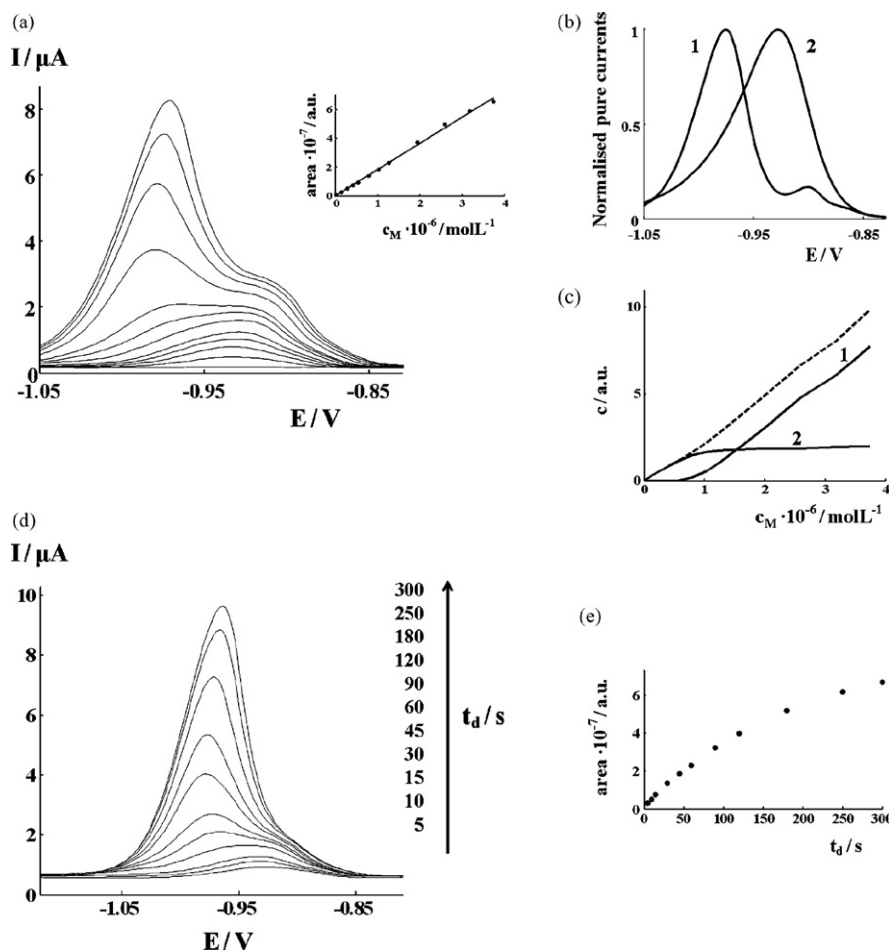


Fig. 2. DPASV measurements of Cd(II) in a BiFE: (a) voltammograms at increasing concentrations of Cd(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ using a deposition potential of -1.05 V , a deposition time of 60 s , a rest time of 5 s , and a rotation speed during the stripping step of 1500 rpm (inset shows the resulting calibration plot); (b) normalized pure signals and (c) concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of DPASV data matrix shown in (a); (d) signal splitting effect observed during the measurements of a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cd(II)}$ solution in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ applying a deposition potential of -1.15 V and a deposition time between 5 and 300 s ; (e) dependence of the total area of both peaks with the deposition time.

To get more reliable information about the evolution of these two overlapping Cd(II) signals, MCR-ALS analysis was applied to the corresponding corrected matrices. In the case of DPASV (Fig. 2a), the best results (lack of fit, lof, of 4.6%) were achieved using two components and the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal-shape for the signal at less negative potential values. The resulting pure voltammograms and concentration profiles are summarized in Fig. 2b and c, respectively. The components have been numbered on the negative direction. The named concentration profiles [19,20,23] describe the relative importance of each component and show that component 2 increases linearly with Cd(II) concentration until the appearance of component 1, just below $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Then, the evolution of component 1 begins to increase linearly while that of component 2 remains constant. It can be seen that both the total area of the voltammograms (inset in Fig. 2a) and the sum of the concentration profiles (dashed line in Fig. 2c) are linear with Cd(II) concentration until a value close to $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Above this concentration some saturation effect was observed (data not shown). The pure voltammograms (Fig. 2b) show that component 1 presents a small double peak since any signal-shape constraint has been applied in order to correct the slight shift that signal 2 undergoes when signal 1 appears.

The reasons for such peak splitting are unclear, but seem to be related with the deposition step. In order to support it, DPASV measurements of a $10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Cd(II) solution, using $E_d = -1.15 \text{ V}$, were carried out at different deposition times (t_d) ranging from 5 to 300 s (Fig. 2d). This study shows a clear dependence of the appearance of the two overlapping peaks on t_d . For $t_d = 5\text{--}15 \text{ s}$, only one peak is observed but, for $t_d > 15 \text{ s}$, the second overlapping peak appears at more negative potentials. The dependence of the total area of both signals on t_d is presented in Fig. 2e, where a saturation effect is also observed at large t_d .

The evolution of CCSCP measurements for increasing Cd(II) concentrations is presented in Fig. 3a. At low concentrations, only the previously described peak (at ca. -0.78 V) is noticed but, like in DPASV, when the concentration increases a second overlapping signal appears at ca. -0.84 V .

The MCR-ALS analysis of the CCSCP corrected data matrix (Fig. 3a) gives the best results (lof of 6.5%) using two components and the same constraints as in DPASV data analysis (Fig. 3b and c). In concentration profiles plot (Fig. 3c), component 2 increases with Cd(II) concentration until the appearance of component 1, and then it gradually stabilizes while component 1 progressively increases. This fact agrees with DPASV data, and again the total area of both peaks becomes linear with Cd(II) concentration, but in CCSCP this

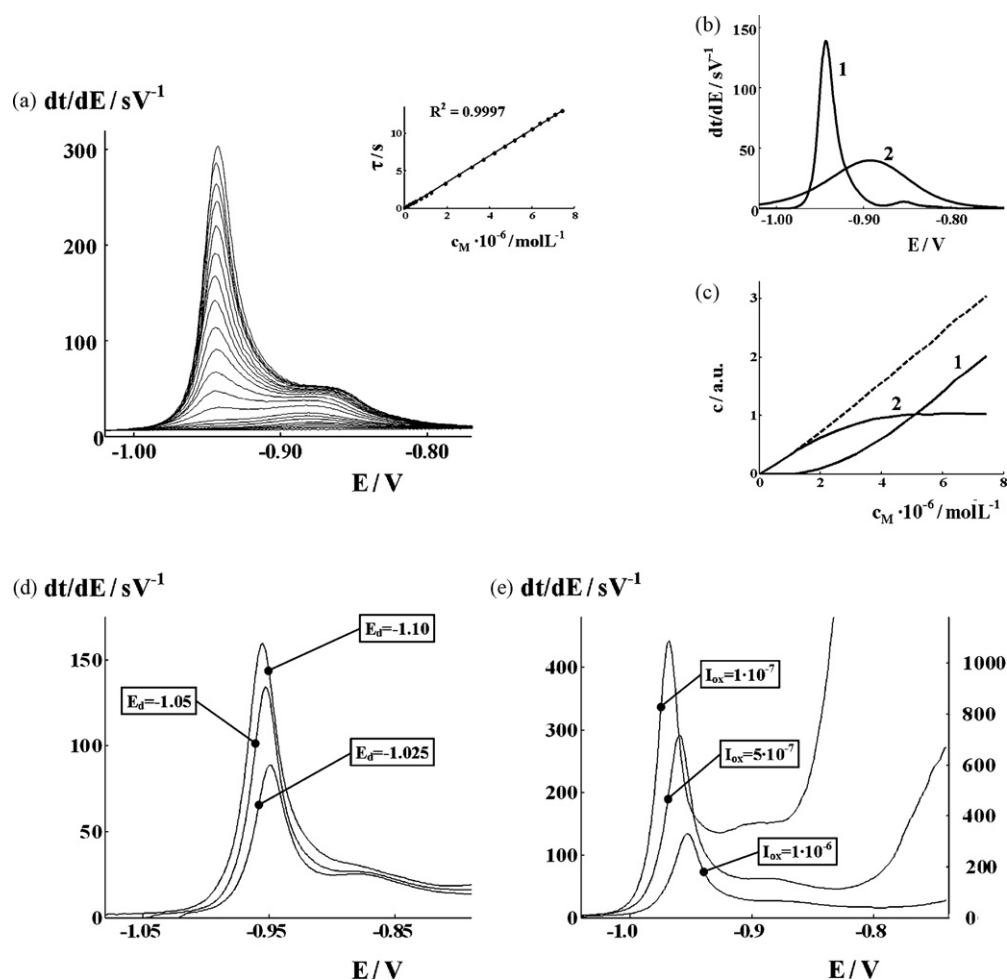


Fig. 3. CCSCP measurements of Cd(II) in a BiFE: (a) chronopotentiograms at $I_{ox} = 10^{-6} \text{ A}$ at increasing concentrations of Cd(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ using a deposition potential of -1.05 V , a deposition time of 60 s , a rest time of 5 s , and a rotation speed during the stripping step of 1500 rpm (inset shows the resulting calibration plot); (b) normalized pure signals and (c) concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of CCSCP data matrix shown in (a). Signal splitting effects observed during the measurements of a $4.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Cd(II) solution in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ applying a deposition time of 60 s : (d) $I_{ox} = 10^{-6} \text{ A}$ and a deposition potential of -1.025 , -1.05 and -1.10 V and (e) deposition potential of -1.05 V and $I_{ox} = 10^{-6} \text{ A}$, $5 \times 10^{-7} \text{ A}$ (left-axis) and 10^{-7} A (right-axis).

linearity holds up to $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Cd(II)}$. The wider linear range in CCSCP may be due to the time required for the stripping step. In DPASV, 80 s are required to reoxidize the reduced metal (100 measurements during the oxidative scan every 0.8 s), while in CCSCP using a $I_{\text{ox}} = 10^{-6} \text{ A}$ only a few seconds are required. If there is any interconversion between the species responsible for the appearance of both peaks, the kinetics of the process would affect more the slower measurement (DPASV), thus producing a greater decrease in data linearity.

The effects of E_d and I_{ox} on the CCSCP overlapping peaks have been also examined (Fig. 3d and e, respectively). The area of the peak at -0.95 V increases as E_d becomes more negative, whereas the area of the second peak (at -0.87 V) remains stabilized. However, the application of different I_{ox} to the same Cd(II) solution, using $E_d = -1.05 \text{ V}$ and $t_d = 60 \text{ s}$, produces chronopotentiograms with monotonous increase of the two overlapping peaks in a wide currents range (Fig. 3e). All these facts again support the relationship between peak splitting and the accumulation step of the reduced cadmium on BiFE.

At the light of the DPASV and CCSCP measurements and the effect of the deposition parameters, it seems that two different processes on the BiFE take place, maybe producing two layers. Initially, either at low Cd(II) concentrations or certain deposition parameters, only the deepest layer is being filled; but, when the concentration of deposited cadmium is increased and the deepest

layer is full, the external layer begins to grow. This is in agreement with both DPASV and CCSCP measurements: the peak at more negative potentials observed for higher Cd(II) concentrations would be due to the reoxidation of the cadmium accumulated in the external layer, and the peak at less negative potentials would be attributed to the reoxidation of cadmium accumulated in the deepest layer of the electrode. This fact has been already provided by Króllicka et al. [18], who indicated that, both the glassy carbon of the support and the bismuth of the film play a key role in the accumulation process.

3.3. Stripping voltammetric and chronopotentiometric measurements of Zn(II)

Stripping voltammetric and chronopotentiometric measurements for increasing concentrations of Zn(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ were carried out applying $E_d = -1.6 \text{ V}$ and $I_{\text{ox}} = 10^{-6} \text{ A}$ in CCSCP (Figs. 4 and 5).

Fig. 4a shows that a wide DPASV signal (at ca. -1.37 V) was observed at low Zn(II) concentrations. After some further Zn(II) additions this signal splits in two overlapping peaks at -1.33 and -1.40 V , which increase steadily with Zn(II) concentration.

The application of MCR-ALS to the corrected DPASV data matrix (Fig. 4a), yields the best results (lof of 5.3%) using two components and the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal-shape for the less negative potential peak

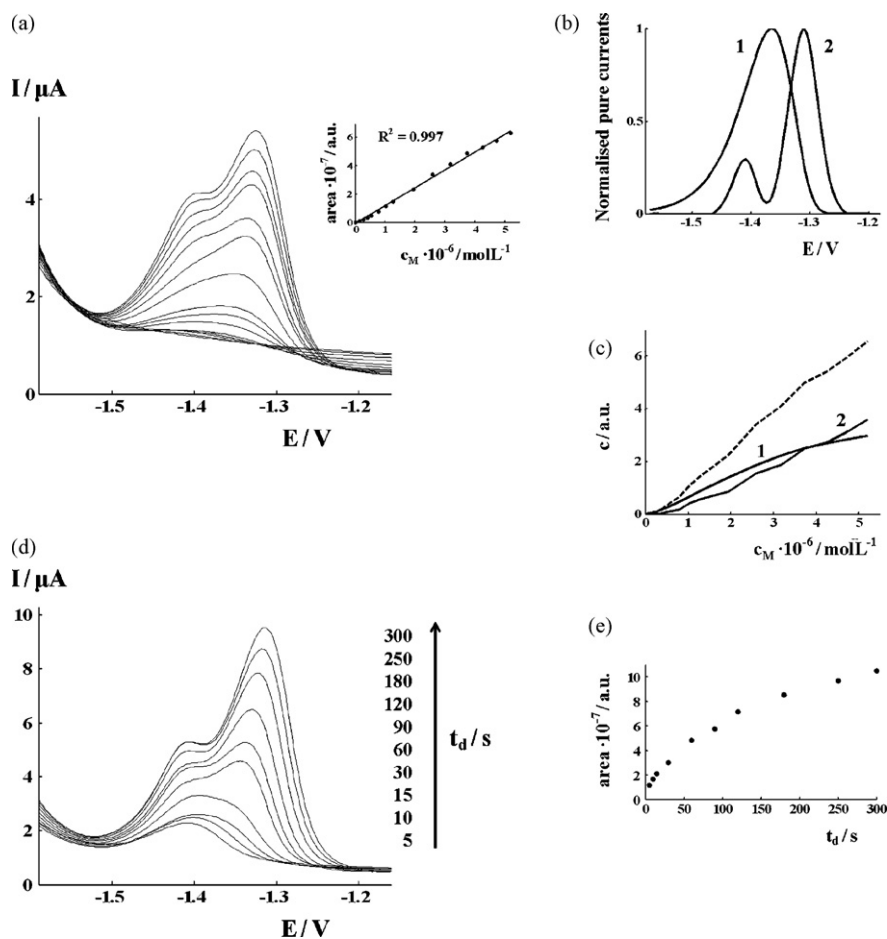


Fig. 4. DPASV measurements of Zn(II) in a BiFE: (a) voltammograms at increasing concentrations of Zn(II) in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ using a deposition potential of -1.60 V , a deposition time of 60 s , a rest time of 5 s , and a rotation speed during the stripping step of 1500 rpm (inset shows the resulting calibration plot); (b) normalized pure signals and (c) concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of DPASV data matrix shown in (a); (d) signal splitting effect observed during the measurements of a $2.3 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1} \text{ Zn(II)}$ solution in $0.01 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ applying a deposition potential of -1.60 V and a deposition time between 5 and 300 s ; (e) dependence of the total area of both peaks with the deposition time.

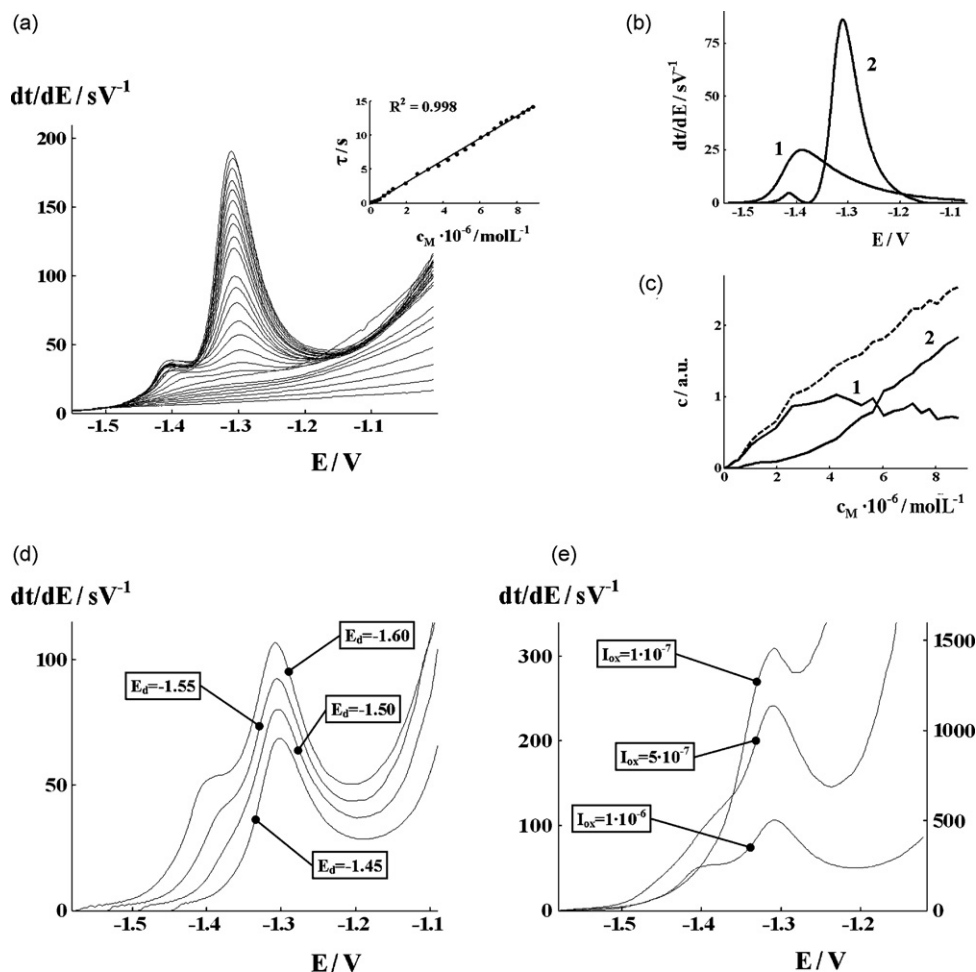


Fig. 5. CCSCP measurements of Zn(II) in a BiFE: (a) chronopotentiograms at $I_{\text{ox}} = 10^{-6}$ A at increasing concentrations of Zn(II) in 0.01 mol L^{-1} KNO_3 using a deposition potential of -1.60 V, a deposition time of 60 s, a rest time of 5 s, and a rotation speed during the stripping step of 1500 rpm (inset shows the resulting calibration plot); (b) normalized pure signals and (c) concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of CCSCP data matrix shown in (a). Signal splitting effects observed during the measurements of a $4.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ Zn(II) solution in 0.01 mol L^{-1} KNO_3 applying a deposition time of 60 s: (d) $I_{\text{ox}} = 10^{-6}$ A and a deposition potential of -1.45 , -1.50 , -1.55 and -1.60 V and (e) deposition potential of -1.60 V and $I_{\text{ox}} = 10^{-6}$ A, 5×10^{-7} A (left-axis) and 10^{-7} A (right-axis).

(Fig. 4b and c). Unlike the case of Cd(II), components 1 and 2 appear from the beginning and increase gradually. Component 1 reaches a quasi plateau from a Zn(II) concentration of $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ while component 2 progressively increases. The total area of voltammograms (inset in Fig. 4a) and the sum of the concentration profiles (dashed line in Fig. 4c) are linear with Zn(II) concentration until a value close to $5.2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, where a saturation effect was detected (data not shown).

In order to study the evolution of such Zn(II) peak splitting with t_d , a series of DPASV measurements were carried out (Fig. 4d). At $t_d < 15$ s the voltammograms show only a wide signal at ca. -1.40 V, while at $t_d > 15$ s it splits in two overlapping peaks at ca. -1.41 and -1.33 V. This behaviour is consistent with the hypothesis that such peak splitting is essentially related with the deposition step. The dependence of the total area of both peaks with t_d is presented in Fig. 4e, which also shows saturation effects at large t_d .

After successive additions of Zn(II), CCSCP measurements (Fig. 5a) show the same behaviour as in DPASV. At low concentrations only a wide signal at ca. -1.36 V is visible but, as concentration increases, two slightly overlapping peaks, at ca. -1.30 and -1.40 V are observed. A linear response of the total area of arranged chronopotentiograms of both peaks as a function of Zn(II) concentration was observed inside the range 1×10^{-7} to $9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$,

which is a wider range than in ASV measurements, as it was seen and explained in Cd(II) studies.

When MCR-ALS analysis is applied to that CCSCP data matrix (Fig. 5a), the best results (lof of 6.3%) were obtained by assuming two components and the same constraints as in DPASV analysis (Fig. 5b and c). As in the MCR-ALS analysis of DPASV data from Zn(II), components 1 and 2 are detected from the beginning, but component 1 seems to stabilize completely at a Zn(II) concentration close to $4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ while component 2 continues growing above $8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Anyway, the presence of both components at the beginning of the titration seems to be less clear than in DPASV treatment due to the scarce differentiation between signals and the baseline during the first chronopotentiograms.

In order to study the influence of E_d and I_{ox} on the signal splitting, some CCSCP measurements have been carried out (Fig. 5d and e). Fig. 5d shows that the chronopotentiogram obtained at $E_d = -1.45$ V has only a peak at -1.30 V, while at $E_d = -1.50$ V, apart from this peak, a shoulder close to -1.38 V begins to grow. Finally, at $E_d = -1.55$ and -1.60 V, two peaks are reported at ca. -1.40 and -1.30 V. In chronopotentiograms obtained with $I_{\text{ox}} = 10^{-7}$ A only a peak at -1.32 V was observed, while with $I_{\text{ox}} = 5 \times 10^{-7}$ A a shoulder appears at about -1.40 V, and finally with $I_{\text{ox}} = 10^{-6}$ A two peaks can be clearly observed at ca. -1.30 and -1.40 V. From these results

it can be stated that both preconcentration and stripping steps are critical in the splitting of Zn(II) signal, which is an important difference with respect to Cd(II).

DPASV and CCSCP measurements of Zn(II) appears to agree with the fact that two association mechanisms or layers are involved in BiFE. But in this case, unlike the behaviour of Cd(II), the early coexistence of two signals suggest that: (i) a layer starts to be filled before long the other one is complete, or (ii) some reduced Zn diffuses continuously from a layer to the other one [18]. This is supported by the fact that in chronopotentiometry short stripping times, which are connected with the application of high currents, would provide a better differentiation between the possible interconversion of species involved in both peaks.

4. Conclusions

From the above-described facts, we can state the following conclusions.

Pb(II) ions produce normal-shaped stripping signals in both DPASV and CCSCP and their areas show a perfect linear dependence on Pb(II) concentration in a wide concentration range. This fact can be very important for testing the applicability of BiFE to study Pb(II) complexation by thiol-rich peptides like phytochelatins and metallothioneins. These substances favor the oxidation of mercury electrodes and this produces many signals strongly overlapping with these of Pb(II). If mercury is replaced by bismuth, it is likely to expect the disappearance or modification of these signals and therefore the simplification of electroanalytical data.

In contrast, Cd(II) ions produce two overlapping peaks in both DPASV and CCSCP. The first signal predominates at low Cd(II) concentrations and it is placed at less negative potentials than the second one. When the second peak appears, it grows at increasing Cd(II) concentrations, and the first one stabilizes. Zn(II) ions yield a wide signal (at more negative potentials) for low concentrations, in both DPASV and CCSCP. For higher concentrations, it stabilizes while the second peak remains growing.

For both Cd(II) and Zn(II), in the absence of the second peak (i.e., at the lowest metal concentrations), the first signal is linear with respect to the metal concentration, and in the presence of both peaks their total area is again linear with respect to the concentration of the metal. From a practical point of view, this means that the linear ranges commonly used for these metal ions in previous works can be extended to quite higher concentrations provided the overall areas of the two peaks are measured. However, it is not easy to decide which peak is better suited for the measurement of potential shifts in the studies of heavy metal complexation.

From a theoretical point of view, it is difficult to explain such signal splitting. Since many experimental evidences suggest that this fact is related to the accumulation step, one possible explanation is that two layers (or two different association mechanisms) are present in the electrode. The internal layer of deposited Cd or Zn (these reoxidized in the first signal) interacts with the electrode in a different way as the layer which is further deposited, maybe including interaction with the glassy carbon of the support.

Taking into account that in the oxidative stripping step a less negative potential implies a higher stabilization of the reduced metal form in the bismuth film, the position of the first signals, as compared to the second ones, suggests that the internal layer of deposited cadmium would be more stable than the following one, whereas in the case of zinc, the internal layers would be less stable as compared to the others. In the case of lead, the maintenance of a single peak in a wide concentration range suggests that all successive layers deposited would have similar interactions with the electrode. This could be related with the different phase diagrams of Bi with the three metals considered [26]. The Bi–Pb phase diagram shows that Pb is quite soluble in Bi (*ca.* 0.7%), whereas solubility of Zn is much lower (although undetermined) and the solubility of Cd is zero. This means that Cd and Zn could be accumulated in the inner layer and/or in the outer one, being attached to the electrode in different ways. However, further research is required to clarify this point, preferably with the help of structural and surface analysis techniques.

Acknowledgements

The authors acknowledge support of the Spanish Ministry of Education and Science (Project CTQ2006-14385-C02-01/BQU) and from the Generalitat of Catalonia (project 2005SGR00186).

References

- [1] J. Heyrovský, *Chem. Listy* 16 (1922) 256.
- [2] J. Barek, A.G. Fogg, A. Muck, J. Zima, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 31 (2001) 291.
- [3] B. Yosypchuk, L. Novotný, *Electroanalysis* 14 (2002) 1733.
- [4] D.W.M. Arrigan, *Analyst* 119 (1994) 1953.
- [5] J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH, Deerfield Beach, FL, 1985.
- [6] J. Wang, B.M. Tian, *Anal. Chem.* 65 (1993) 1529.
- [7] E.P. Achterberg, C. Braungrat, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 381.
- [8] M.A. Nolan, S.P. Kounaves, *Anal. Chem.* 71 (1999) 3567.
- [9] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3218.
- [10] G. Kefala, A. Economou, A. Voulgaropoulos, M. Sofoniou, *Talanta* 61 (2003) 603.
- [11] J. Wang, J. Lu, U.A. Kirgöz, S.B. Hocevar, B. Ogorevc, *Anal. Chim. Acta* 434 (2001) 29.
- [12] D. Demetriades, A. Economou, A. Voulgaropoulos, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 167.
- [13] M. Esteban, E. Casassas, *Trends Anal. Chem.* 13 (1994) 110.
- [14] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis* 19 (2007) 2039.
- [15] S.B. Hocevar, J. Wang, R.P. Deo, B. Ogorevc, *Electroanalysis* 14 (2002) 112.
- [16] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 1341.
- [17] A. Economou, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 334.
- [18] A. Królicka, A. Bobrowski, A. Kowal, *Electroanalysis* 18 (2006) 1649.
- [19] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [20] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86.
- [21] N. Serrano, I. Sestáková, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, *J. Electroanal. Chem.* 591 (2006) 105.
- [22] Matlab version 7.3.0.267, Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 2006.
- [23] R. Tauler, A.K. Smilde, B.R. Kowalski, *J. Chemometr.* 9 (1995) 31.
- [24] A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Analyst* 132 (2008) 112.
- [25] N. Serrano, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 560 (2003) 105.
- [26] ASM Handbook, 10th ed., vol. 3, Alloy phase diagrams, Section 2, Ohio, USA, 1992.

11.5 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

A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban

The Analyst 133 (2008) 470-477

En los artículos anteriores se han presentado algunas estrategias para superar los problemas derivados de la falta de linealidad de los datos polarográficos y del solapamiento entre señales, aplicándose a sistemas relativamente sencillos en los que el Cd(II) y el Zn(II) actuaban como metales complejantes. Sin embargo, cuando la complejación de fitoquelatinas se produce con Pb(II), las causas que originan la pérdida de linealidad suelen ser más importantes, y el solapamiento que produce la interferencia de las señales anódicas es mucho mayor.

Para llegar a una resolución completa del sistema estudiado en este artículo, complejación de Pb(II) y PC₃, se estudian tanto la valoración directa (ligando sobre metal) como la valoración inversa (metal sobre ligando). La matriz resultante de la valoración directa contiene señales anódicas con un movimiento lateral tan prolongado que precisa la aplicación previa del programa *shifffit* para poder realizar un análisis mediante MCR-ALS. La matriz polarográfica de la valoración inversa aporta resultados ambiguos por lo que se aumenta de forma que también contenga medidas espectroscópicas y así realizar un análisis simultáneo de ambos tipos de datos. La imagen dinámica del proceso de complejación se extrae por comparación de los resultados de ambas valoraciones, lo que da idea de la dificultad para resolver este tipo de sistemas.

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

Aristides Alberich, José Manuel Díaz-Cruz,* Cristina Ariño and Miquel Esteban

Received 27th November 2007, Accepted 21st January 2008

First published as an Advance Article on the web 14th February 2008

DOI: 10.1039/b718285f

The combined use of differential pulse polarography (DPP), circular dichroism (CD) and multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS), with potential shift correction for data analysis, provides valuable information on the complexation of Pb(II) by the phytochelatin (γ -Glu-Cys)₃-Gly (PC₃). All data confirm the formation of the predominant 1 : 1 Pb-PC₃ complex. However, in the presence of an excess of Pb(II), the same complex seems to be present but with some modification in its structure. This is suggested by the shift towards more negative potentials of the DPP signal, and by a dramatic change in CD spectra. This evolution seems to be more related to a conformational change of the complex than with a modification of the electrochemical process kinetics.

1. Introduction

The combined use of voltammetric techniques and powerful chemometric methods, such as multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS), has proved to be very useful for the study of heavy metal complexation by a variety of naturally occurring ligands.^{1,2} The usual method is based on voltammetric titrations of a metal solution with the considered ligand and *vice versa*, and the subsequent analysis of the experimental data matrices by MCR-ALS. For that, assumption of linearity of data is a crucial point. In order to overcome problems arising from lack of linearity, some new strategies have been proposed by our group. Thus, linearly corrected voltammograms, by compensation of the potential shifts of some signals, have been obtained through a mathematical algorithm.³ Moreover, the conditions for using this approach have been discussed.

Another strategy to solve some uncertainties in the results is the simultaneous MCR-ALS analysis of experiments carried out under the same conditions by different techniques such as, for instance, differential pulse polarography (DPP) and circular dichroism spectroscopy (CD).⁴ The improvements in this approach come from the different sensitivities with respect to the chemical species of these techniques. Moreover, CD data do not present problems of lack of linearity.

Among the naturally occurring ligands studied by these approaches, phytochelatins (PC_{*n*}) play a key role. PC_{*n*} are low molecular weight polypeptides, with the general structure (γ -Glu-Cys)_{*n*}-Gly and *n* generally ranging from 2 to 6, synthesized by plants, fungi and algae when an increase in the concentration

of heavy metals occurs in their environment.^{5,6} PC_{*n*} are capable of binding metal ions, mainly *via* thiolate coordination, complexing and then placing them into vacuoles where they are no longer toxic to the plant.^{7,8} In this way, plants clean up and restore the damaged ecosystems, the basis of phytoremediation approaches.^{9,10} However, the sequence of formation and the final stoichiometry of the different PC_{*n*}-metal complexes involved remain partially studied. For this reason, it is of great interest to study the complexation mechanisms in order to understand and optimise processes of phytoremediation.

The voltammetry/MCR-ALS approach has allowed us to obtain valuable information on the complexation processes of Cd(II) and Zn(II) with PC₂, PC₃ and PC₄.^{11–13} Complexation of Pb(II) with different ligands has also been studied,^{14,15} but the interference of anodic signals due to the formation of mercurous thiolates^{16,17} produces strong overlapping of signals.

The main aim of this work is to check the possibilities of the combined use of the strategies described above to solve a rather involved system. Thus, both the potential shift correction algorithm (to minimize the lack of linearity of voltammetric data) and the simultaneous MCR-ALS analysis of spectro- and electrochemical data are used to study the complexation of Pb(II) by PC₃. This system presents high overlapping of peaks and large potential shifts of some signals.

2. Experimental

2.1. Chemicals and instrumentation

The phytochelatin (γ -Glu-Cys)₃-Gly (PC₃) trifluoroacetate was provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity of 91.0%. All other reagents were of Merck or Sigma/Aldrich analytical grade. Pb(II) stock solutions of 10⁻² mol L⁻¹ were prepared by dissolving Pb(NO₃)₂ in water and standardised complexometrically. 2,2-Bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrilotriethanol

Departament de Química Analítica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028, Barcelona, Spain.
E-mail: josemanuel.diaz@ub.edu; Fax: +34 934021233; Tel: +34 934039116

(Bis-Tris)–HNO₃ buffer solution was chosen because of its pH range, absence of polarographic signals and cutoff value in CD. All solutions were prepared in ultrapure water (Milli-Q plus 185, Millipore).

Differential pulse polarographic (DPP) measurements were performed in a 757VA Computrace (Metrohm) using a static mercury drop electrode (SMDE, drop area 0.6 mm²), an Ag|AgCl|3 mol L⁻¹ KCl reference electrode and a glassy carbon auxiliary electrode. An Orion SA 720 pH-meter was used for pH control. All measurements were carried out using a glass cell at thermostated room temperature (20 °C), and under purified nitrogen atmosphere (Linde N50). DPP parameters were as follows: pulse time 50 ms, pulse amplitude 50 mV, drop time 0.8 s and potential step 4 mV.

CD spectra were obtained in a Jasco Spectropolarimeter, model J-810. Measuring solutions were scanned, from 320 to 220 nm, at 1 nm intervals with a 20 nm min⁻¹ scan speed, 1 nm bandwidth and 8 s response. A cylindrical quartz cell of 10 mm lightpath was used. CD spectra recorded were the mean of three accumulations for each run. Measurements were done at room temperature.

2.2. Procedures

Complexometric titrations were performed at Bis-Tris (pH = 6.8) 0.05 mol L⁻¹ (DPP) and 5 × 10⁻³ mol L⁻¹ (CD) at the same metal-to-ligand ratios for both techniques.

In DPP titrations of Pb(II) with PC₃, 20 mL of a 1 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ Pb(II) were placed into the cell and purged with nitrogen for 40 minutes. DPP curves were then recorded. After recording reproducible DPP curves, aliquots containing 4 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ PC₃ solution were added and the respective DPP curves recorded. After every addition, solutions were purged and mechanically stirred for 1.5 minutes. Titrations were also performed in the opposite way: 20 mL of a 2 × 10⁻⁵ mol L⁻¹ PC₃ solution were titrated with a 8 × 10⁻⁴ mol L⁻¹ Pb(II) solution following the same procedure.

In CD titrations, the same concentrations are used. CD spectra were recorded adding aliquots of the Pb(II) solution to 2 mL of the PC₃ solution placed into the quartz cell and *vice versa*. No influence of oxygen was observed during CD spectra recording. In all cases, PC₃ solutions were freshly prepared before experiments by dissolving the peptide in a previously deaerated buffer solution in order to avoid oxidation of cystein thiolates.

3. Data treatment

Voltammograms and spectra were smoothed, baseline-corrected, and converted into data matrices by means of some homemade programs implemented in Matlab.¹⁸ When a nonnegligible volume of the titrant solution was added, the data were also corrected for dilution.

The main characteristics of MCR-ALS method and its applications in the analysis of voltammetric data have been described elsewhere,^{1,2} including the simultaneous analysis of two sets of spectro- and electrochemical data.⁴ MCR-ALS factorizes the experimental matrix as a product of two matrices that contain for every component the evolution of the concentrations (matrix

C) and their corresponding response vectors (matrix V^T), plus a matrix expressing the relative error (matrix X) of the process: $I = C V^T + X$. This matricial decomposition is carried out in an iterative way applying some constraints to ensure a physico-chemical meaning of the mathematical solution.

In the simultaneous analysis of data obtained by different techniques, submatrices must share the same distribution of the chemical species along all the experiments.⁴ Consequently, CD and DPP titrations must be performed at the same initial total concentrations of metal and ligand and at the same values of metal-to-ligand ratio for every addition. Furthermore, this procedure assures the same number of rows for both submatrices, a prerequisite to combine them into an augmented data matrix. In ALS factorization, constraints are applied independently to both submatrices in order to respect the nature of every set of data, and the resulting pure response vectors are constituted by one part of individual voltammograms and another of pure spectra.

The analysis of the resulting matrices yields in both cases chemical information that allows us to obtain the possible stoichiometries (provided by the metal : ligand ratios where species appear, disappear or stabilize) and some information about the relative stability of metal bindings and, as a consequence, of the complexes (the more negative is the peak potential, the more stable are the bindings of the complex).

Finally, due to the nature of electrochemical measurements^{1,2} it is important to note that the concept of “component” in MCR-ALS refers to the signal emanating from an electrochemical process, and not to a chemical species type, as it is typically encountered in spectroscopic data.^{19,20} Although algorithms like singular value decomposition (SVD)²¹ or simple-to-use interactive self-modeling mixture analysis (SIMPLISMA)²² can provide information on the optimum number of components, it is crucial to take into account the previous electrochemical knowledge of the system. For instance, in complexes containing two different electroactive sites (*e.g.*, two metal ions reducing at different potentials), two components (*i.e.*, electrochemical processes) are associated with a unique chemical species. These considerations play a key role in further interpretation of MCR-ALS results. To this end, component assignments will be maintained throughout this paper for the four different types of experiments conducted.

The progressive potential shift of some voltammetric signals observed along the titrations of the Pb(II)–PC₃ system makes necessary the use, as a previous stage to the MCR-ALS analysis, of the *shiftfit* program.³ As explained, *shiftfit* empirically corrects the lateral shift of one or more signals of the voltammetric data matrix I_{exp} , displacing every signal in every voltammogram a potential value ΔE to the reference position fixed by an initial estimate V_0 of pure unitary voltammograms. Then, ΔE values are optimised iteratively to create a new matrix I_{cor} , analogous to the experimental one, but with a gain in linearity of data. This iterative optimization is made by means of some homemade functions named *shiftcalc* and *shiftfit*, implemented also in Matlab. In fact, the application of the *shiftfit* program to a data matrix yields three new matrices: (i) the aforementioned corrected matrix I_{cor} , where every moving signal has been aligned in such a way that standard MCR-ALS analysis can be applied with more reliable results; (ii)

a matrix \mathbf{C} containing a rough estimate of the concentration profiles of the components considered in the initial estimate; and (iii) a matrix $\Delta\mathbf{E}$ containing the evolution of all the optimised potential shifts along the different scans for the signals which are moved.

The goodness of the correction can be evaluated by a mathematical operation involving the three resulting matrices that reverts the potential shift correction to obtain a reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} that is compared to \mathbf{I}_{exp} . Generally, the lack of agreement between the experimental and the reproduced matrices does not come from the calculation and reproduction of potential shifts in mobile signals, but from the differences in the shape or width of some signals, specially anodic signals. This is because the reproduced matrix \mathbf{I}_{rep} is calculated with the initial estimation \mathbf{V}_0 where every component has a unitary polarogram whose shape is purely Gaussian (although it can be asymmetric) unlike the real polarographic signals. A suitable solution could be the use of the resulting matrix \mathbf{V}^T (of the subsequent MCR-ALS analysis of \mathbf{I}_{cor}) as the \mathbf{V}_0 of a new *shiftfit* process applied to the experimental matrix, given that the pure signals obtained

applying the signal shape constraint in ALS iterations contain a larger number of parameters than Gaussian peaks.

Finally, it is important to remark that the application of *shiftfit* to an experimental data set must be subjected to some necessary considerations about the different causes of the potential shifts and to which kinds of signals are affected. Then, when corrections are made, standard MCR-ALS analysis can be applied to the resulting matrix \mathbf{I}_{cor} .

4. Results and discussion

4.1. Titration of Pb(II) with PC₃

In Fig. 1, \mathbf{I}_{exp} shows the set of experimental DPP curves obtained in the titration of a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution with PC₃, until a PC₃ : Pb(II) ratio > 3 is reached. Taking advantage of our previous experience in PC_{*n*}-Pb(II) systems,^{14,15} the most relevant characteristics of \mathbf{I}_{exp} are: (i) the reductions of free Pb(II) (signal 1, at *ca.* -0.45 V) and of a Pb(II)-PC₃ complex (signal 2, at -0.65 V); (ii) an anodic oxidation signal associated with the

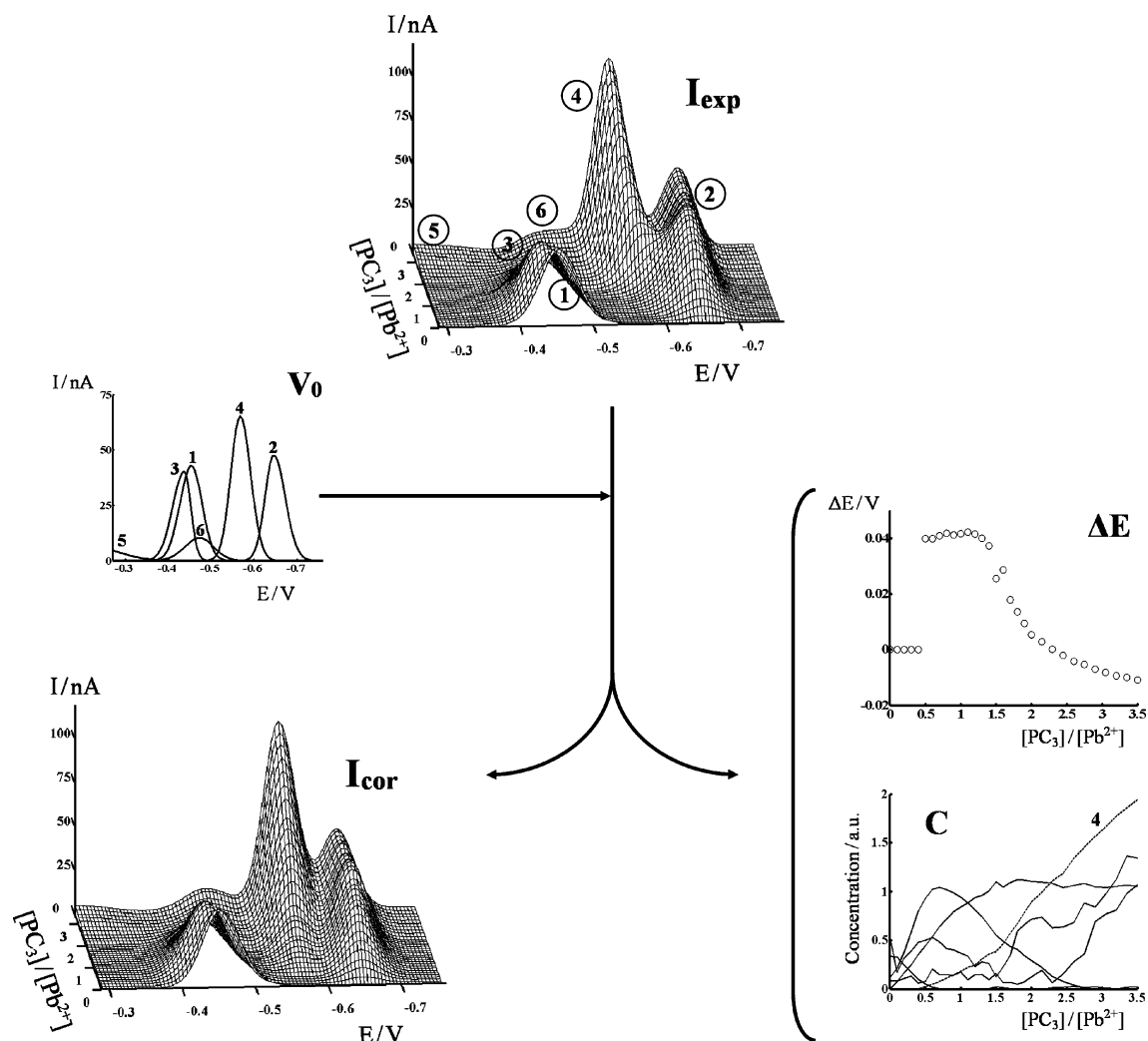


Fig. 1 Application of *shiftfit* program to the experimental data matrix (\mathbf{I}_{exp}) containing the differential pulse polarograms measured for a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution titrated with PC₃ at pH 6.8 in 0.05 mol L^{-1} Bis-Tris buffer. This application uses the reference signals shown in \mathbf{V}_0 and produces a corrected matrix (\mathbf{I}_{cor}), a series of potential shifts ($\Delta\mathbf{E}$) and the concentration profiles (\mathbf{C}).

complex formation (signal 3) strongly overlapped with signal 1; (iii) a peak (signal 4) related to free PC_3 , at PC_3 - Pb(II) ratios > 1.5 ; (iv) the large shift (*ca.* 60 mV, towards less negative potentials) of signal 4; and (v) some baseline distortions (signals 5 and 6, at -0.48 and -0.30 V respectively) related to free PC_3 at the end of the titration.

Points (iv) and (v) suggest a loss of linearity of the electrochemical data. Although the observation of \mathbf{I}_{exp} seems to indicate 4 components, the SVD estimate of the number of components (nc) necessary to explain the evolution of the titration (Fig. 2, open points) yields a higher number of components. The MCR-ALS analysis of \mathbf{I}_{exp} considering 4 components does not allow one to obtain any result due to unsolvable selectivity problems of all signals and divergence in the ALS optimization process. If two components are used to solve signal 4 (although it seems clearly due to only one electrochemical process), ALS converges but the lack of fit is too high ($> 12\%$) and the PC_3 concentration profiles are unrealistic (results not shown).

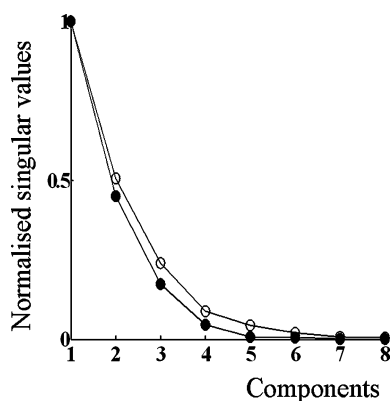


Fig. 2 Singular value decomposition of data sets in Fig 1: (●) corrected matrix, (○) experimental matrix.

The lack of linearity due to the potential shift of signal 4 can be solved *a priori* by applying the *shiftfit* algorithm as a previous step to MCR-ALS. This peak is related to the anodic oxidation of Hg in the presence of free PC_3 , and it appears (and increases) when free Pb(II) is exhausted and the signal of the complex is constant and maximum. The non-linear behaviour of this kind of anodic oxidation signal is well known,¹⁴ and its own movement does not affect the reduction peaks of complexed metal. Therefore, the application of the *shiftfit* program does not need any additional justification.³ The rest of the signals in \mathbf{I}_{exp} appear at the same potential along the titration or their lateral shift can be perfectly assumed by MCR-ALS.

The *shiftfit* algorithm needs an initial estimate of unitary voltammograms, \mathbf{V}_0 , with so many components as signals are observed during the titration. This estimate is built with a homemade subroutine named *peakmaker* implemented in Matlab.³ In this case, as Fig. 1 shows, 6 components are considered: free Pb(II) (component 1), the complex (component 2), the anodic oxidation signals related to the complex (component 3), free PC_3 (component 4), and components 5 and 6 for the two small peaks at -0.3 and -0.48 V. Fig. 1 shows that three different matrices are obtained from the application of the *shiftfit* algorithm (lof = 3.8%): (i) the corrected matrix \mathbf{I}_{cor} , where signal 4 appears at a fixed potential; (ii) a matrix $\Delta\mathbf{E}$ that contains, for signal 4 and

for every DPP curve, the values of the subtraction between the new optimised peak potential of \mathbf{I}_{cor} and the one of reference of \mathbf{V}_0 ; and (iii) a matrix \mathbf{C} containing a rough estimate of the concentration profiles of the components considered in \mathbf{V}_0 .

It is interesting to observe in $\Delta\mathbf{E}$ how the potential shift of signal 4 is corrected even when the signal is still imperceptible because it is kept hidden by the signal of the $\text{Pb(II)}-\text{PC}_3$ complex. However, *shiftfit* interprets the widening in the less negative potential part of signal 2 as the origin of signal 4. This fact is doubly reflected in \mathbf{I}_{cor} (and in the concentration profile of component 4 in matrix \mathbf{C}) where signal 4 comes up before, and the current that *shiftfit* considers to belong to signal 4 is subtracted to the current of signal 2 at the ratio values they are overlapped. This could help in the interpretation of concentration profiles once MCR-ALS is applied to \mathbf{I}_{cor} . The other appreciable difference between \mathbf{I}_{exp} and \mathbf{I}_{cor} is the decrease in the number of components obtained by SVD (Fig. 2, full points), which indicates the gain of linearity of \mathbf{I}_{cor} data.

The MCR-ALS analysis of \mathbf{I}_{cor} yields the best results (lof = 3.1%) assuming 4 components and applying the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals), selectivity for Pb(II) at the beginning and at the very end of the titration, and DPP-signal-shape for all components except for free PC_3 (since this component can contain the two small signals related also with its anodic oxidation processes). It must be noticed that an overall lack of fit including the correction of potential shift and the MCR-ALS processes cannot be calculated for this experiment because $\Delta\mathbf{E}$ (optimised by *shiftfit*) and the \mathbf{CV}^T product (optimised by MCR-ALS) do not have the same number of components.³

In Fig. 3a, component 1 is undoubtedly associated with the reduction of free Pb(II) , whereas component 4 represents redox processes of the $\text{Hg}-\text{PC}_3$ complexes formed on the mercury electrode surface that depend on the concentration of free ligand.¹⁴ Component 2 would be associated with the reduction of Pb(II) bound to PC_3 , and component 3 would be the anodic signal associated to the $\text{Pb(II)}-\text{PC}_3$ complex, as it has been seen in many analogous systems.¹⁵ The concentration profiles (Fig. 3b) suggest the formation of only the 1 : 1 $\text{Pb(II)}-\text{PC}_3$ complex since component 2 increases until a PC_3 -to- Pb(II) ratio of 1, and the projection (extrapolation at the x -axis) of free PC_3 (component 4) profile reaches that value. However, the projection of free Pb(II) (component 1) indicates its practical exhaustion at a PC_3 -to- Pb(II) ratio below 1. The resolution of the profile of component 1 is probably affected by the very strong overlapping with component 3, and this introduces some uncertainties in the interpretation of the MCR-ALS results. For this reason, a titration of Pb(II) with PC_3 was done by CD spectroscopy since this technique has been demonstrated to be very useful to complement and clarify results obtained by electrochemical means.⁴ In Fig. 4, the evolution of the shape of CD spectra suggests the presence of two different contributions during the initial part of the titration. In contrast, the shape of the spectra remain constant at PC_3 -to- Pb(II) ratios over 1, in good agreement with a previous CD-UV-Vis work where only one $\text{Pb}-\text{PC}_3$ complex was detected in the presence of an excess of ligand.²³ Qualitatively this behaviour has its analogy with the DPP titration (first additions in \mathbf{I}_{exp}) where the signal of the complex undergoes a progressive widening and a very slight

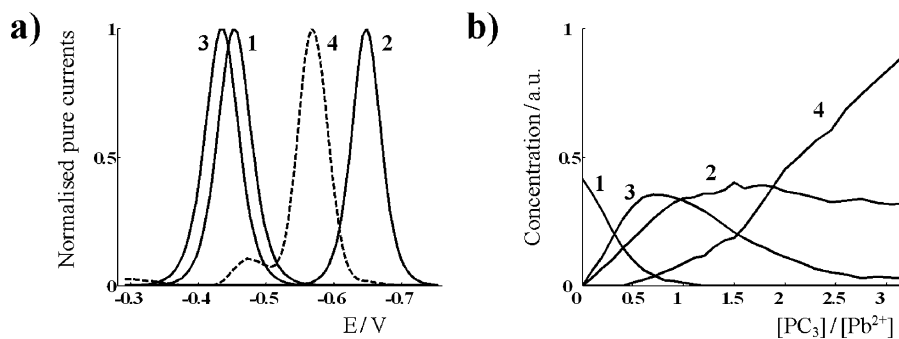


Fig. 3 Pure voltammograms (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS analysis of the corrected matrix in Fig. 1.

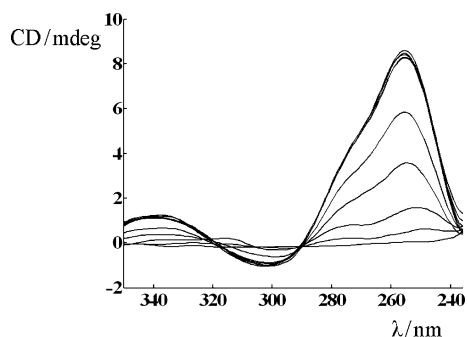


Fig. 4 Experimental data showing the CD spectra measured for a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution titrated with PC_3 in increments of the ligand-to-metal ratio of 0.2 (pH 6.8 in $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ Bis-Tris buffer).

potential shift towards less negative values as the excess of Pb(II) decreases. A simultaneous MCR-ALS analysis of both DPP and CD experimental data matrices was done to verify the existence of the two species that could be visually intuited, but the scarce differences in either the spectra or the polarograms prevented us to obtain more conclusive information (results not shown).

At this point, the study of the complexation process by the inverse titrations is required. Although the natural complexation mechanism in plants is by synthesizing PC_n and related compounds once heavy metals have entered in the cellular medium, our experience reveals that the titration of ligands with heavy metals (specially in PC_x -Pb(II) systems) yields a more valuable and reliable information that can help to discern ambiguities of the direct titrations.

4.2. Titration of PC_3 with Pb(II): electrochemical study

Voltammograms of the titration of a PC_3 solution with Pb(II) are represented as the I_{DPP} matrix in Fig. 5. At the beginning of the titration, only the anodic signal related to free PC_3 (signal 4, at *ca.* -0.57 V) is observed. When Pb(II) is added, this signal decreases while two new signals appear, one associated with the formation of a complex (signal 2, at *ca.* -0.64 V) and the other with its anodic process (signal 3, at *ca.* -0.43 V). While signal 2 remains constant, a signal related to the reduction of free Pb(II) (signal 1, at *ca.* -0.45 V) appears overlapped to signal 3. In fact, signal 1 is not entirely recognizable until its height exceeds that of signal 3. An accurate observation of the curves shows a potential shift of signal 3 to more positive values (*ca.* 30 mV), and of signal 2 towards more negative values (*ca.* 15 mV) once Pb(II) remains free.

The MCR-ALS analysis of I_{DPP} considering four components (results not shown) presents some problems related to selectivity of the signals that reveal the necessity of a fifth component in order to explain the lateral shift of signal 2. The best MCR-ALS results assuming five components (lof = 13.0%, Fig. 5a and b) were achieved with non-negativity constraints for both concentrations and signals, selectivity for PC_3 at the beginning of the titration, and DPP-signal-shape for all components except for free PC_3 (in order to include the large tail of this signal). *A priori*, the interpretation of the MCR-ALS results seems quite simple since all the concentration profiles (Fig. 5b) indicate the formation of a 1 : 1 complex: the free PC_3 ligand (component 4) concentration decreases and the complex (component 2) concentration increases until a Pb(II)-to- PC_3 ratio of *ca.* 1. With regards to free Pb(II) (component 1), the projection of its concentration profile shows an interception with the *x*-axis at a Pb(II) : PC_3 ratio value of 1. Unlike in the precedent titration, the profile of free Pb(II) can be considered now more reliable since its overlapping with signal 3 takes place only during a part of the titration. After this point, the concentration of component 2 decreases and the fifth component (component 2', also related to Pb(II) complexes) increases without a clear stoichiometry during the rest of the titration. This component also appears with an anomalous profile before Pb(II)-to- PC_3 ratio of 1 because MCR-ALS always presents difficulties in locating properly the unitary voltammograms of signals undergoing slow and progressive potential shifts. This drawback together with the overlapping between signals 1 and 3 is the cause of the large error for this analysis.

From these results, the 1 : 1 Pb(II) : PC_3 complex is formed (component 2) but, once the Pb(II) added remains as free cation, the signal of the complex slightly shifts to more negative potentials (component 2'). This could be due to a new conformation of that complex with similar, but slightly stronger, metal bonds. Either a change in the electrochemical reversibility of the complex reduction (as the narrower width of its unitary voltammogram compared with the one of component 2 suggests) or a modification in the association-dissociation kinetics could be also possible.

4.3. Titration of PC_3 with Pb(II): simultaneous electrochemical and CD-spectroscopic study

Because the voltammetric techniques essentially respond to the strength of the different metal bindings but are not very selective

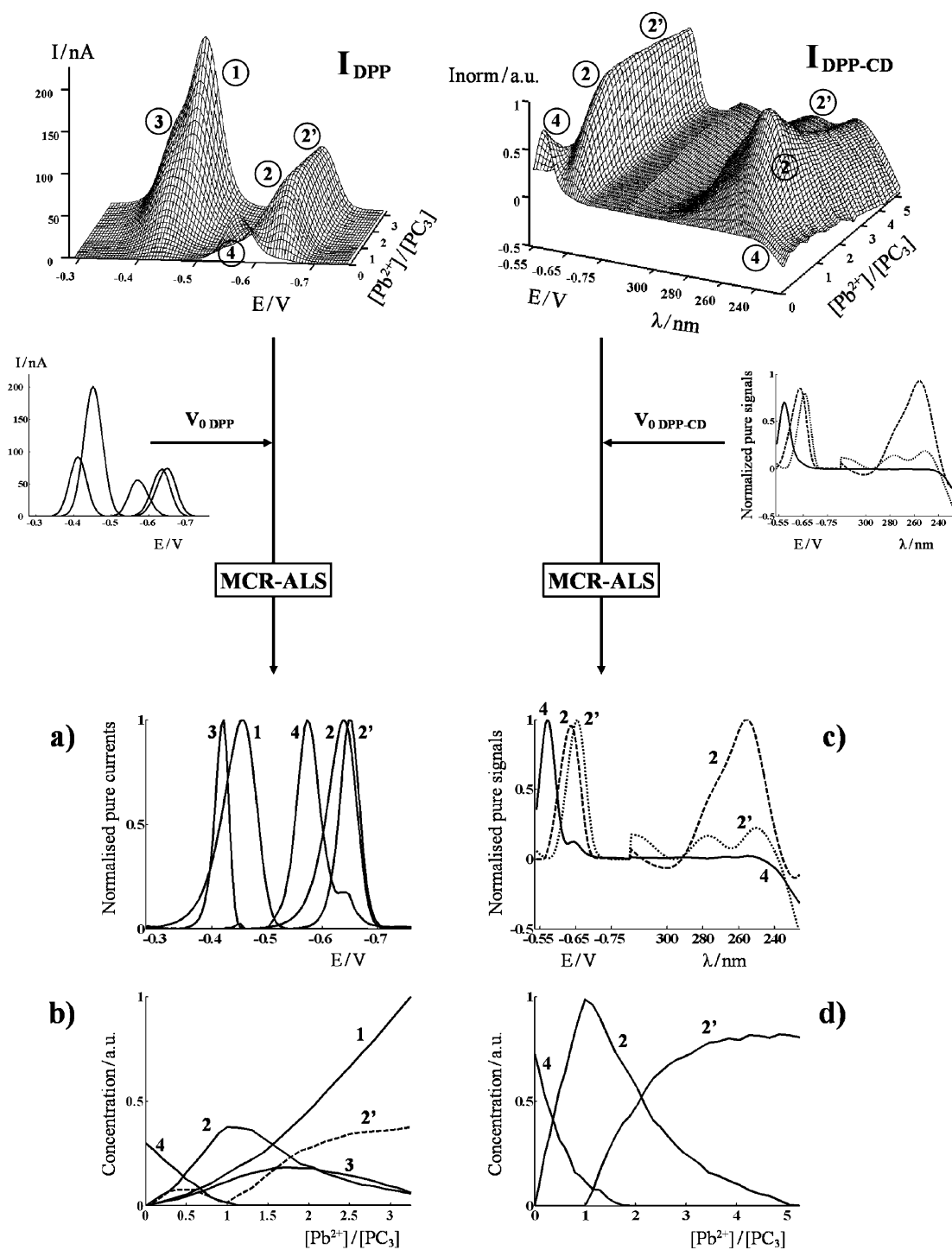


Fig. 5 Normalised pure voltammograms (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS analysis of the electrochemical data matrix (I_{DPP}); normalised unitary response vectors (c) and concentration profiles (d) obtained in the MCR-ALS analysis of the augmented matrix containing electrochemical and spectroscopic data ($I_{\text{DPP-CD}}$). Both titrations have been measured for a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ PC}_3$ solution titrated with Pb(II) at pH 6.8 in $0.05 \text{ (} I_{\text{DPP}} \text{)}$ and $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1} \text{ (} I_{\text{CD}} \text{)}$ Bis-Tris buffer. The initial estimations for both MCR-ALS analyses are indicated as $V_{0 \text{ DPP}}$ and $V_{0 \text{ DPP-CD}}$, respectively.

with respect to the possible conformational changes in the complexes, the same titration of PC_3 with Pb(II) was carried out by CD. The simultaneous MCR-ALS analysis of both kinds of data could confirm the information already extracted and clarify some unsolved points, in this case, basically the true nature of component 2'.

A row-wise augmented data matrix (Fig. 5, $I_{\text{DPP-CD}}$) was built after rescaling the polarograms (DPP submatrix) and the spectra (CD submatrix) by dividing both by their respective maximum absolute value, in order to have a similar relative influence on the subsequent iterative ALS procedure of the augmented data matrix. This preliminary step is necessary since

these techniques present a very different magnitude of their intensities. Taking into account that in CD neither free metal nor species related to anodic processes produce any signal, the DPP submatrix has been cut to remove these components. Moreover, this simplification enables an easier selection of the initial estimate of $V_{0DPP-CD}$. Unlike the case of DPP data alone, where the characteristic peak shape of signals allowed us to construct the initial estimate of pure signals by means of gaussian peaks, the lack of a well defined shape in the CD spectra of pure species required the use of an alternative strategy. For this purpose we used SIMPLISMA,²² a self-modelling mixture analysis method based on the evaluation of the purity of each experimental spectra and the selection of a set of these spectra (the most dissimilar among the purest ones) as initial estimates of the corresponding pure signals. As SIMPLISMA was originally developed for positive data, a constant value had to be added to CD spectra (with positive and negative regions) to get a fully positive matrix. Obviously, once SIMPLISMA provided the estimations of pure spectra, the same constant value had to be subtracted from them. It must be noted that the relatively small number of species contributing to CD spectra (as compared to the large deal of electroactive species) allows an effective application of SIMPLISMA. Regarding SVD (results not shown), both individual submatrices and the augmented matrix indicate the presence of three components to explain variability of data, which proves the good correlation between the complexation processes followed by both titrations.

The best MCR-ALS results (lof = 4.2%) were obtained assuming: (i) three components; (ii) the non-negativity constraint for concentrations (for both submatrices); (iii) non-negativity for DPP-signals; and (iv) selectivity for free PC_3 at the beginning and at the very end of both titrations. Fig. 5c shows both the pure voltammograms and spectra, and Fig. 5d the common concentration profiles to both submatrices obtained after the MCR-ALS factorization. It is remarkable that the low error obtained is well distributed between the two submatrices: lof of 3.5% and 4.9% for the DPP- and the CD-submatrix, respectively.

The unitary CD-spectra of components 2 and 2' (Fig. 5c) are very clearly differentiated, allowing MCR-ALS to place now the unitary voltammograms of component 2' more properly in the DPP part of the same matrix. Compared with the MCR-ALS analysis of I_{DPP} (Fig. 5a and b), there is only a difference of some millivolts in the position of the unitary voltammogram of 2', but the effects on the concentration profile of this component are important.

Fig. 5d shows that free PC_3 (component 4) decreases while the $PbPC_3$ complex (component 2) is forming. Nevertheless, component 2' only appears after a $Pb(II)$ -to- PC_3 ratio of 1, but its stoichiometry can not be deduced. Because component 2' presents its own CD-spectra (Fig. 5c) and it only appears when the added $Pb(II)$ remains as free cation (according to the analysis of the DPP titration), it can be assured that component 2' is the same $PbPC_3$ complex already formed but with some different characteristics (for instance, a different spatial conformation).

4.4. Comparison between titrations

Finally, these results can be easily contrasted with those of the titration of $Pb(II)$ with PC_3 , in order to extract common

information from both experiments. Despite the impossibility of a simultaneous MCR analysis of the polarographic and spectroscopic data for the titration of $Pb(II)$ with PC_3 , the formation of a $PbPC_3$ complex in which the $Pb(II)$ would be bound to two thiol groups of the same molecule of PC_3 was suggested in the MCR-ALS analysis of the voltammetric matrix after the *shiftfit* correction. Moreover, if now Fig. 5c is compared with Fig. 4 and with the first voltammograms of I_{exp} in Fig. 1, the same behaviour (depending on the excess of free $Pb(II)$ or free PC_3) can be observed. So, this complex would present two different forms in both titrations: when there is an excess of $Pb(II)$, the form of the $PbPC_3$ complex that predominates is more electrochemically irreversible and has a stronger metal-thiol bond (since the reduction peak of the signal is narrower and occurs at a slightly more negative potential) and, on the contrary, when there is not an excess of $Pb(II)$ the predominant form of the $PbPC_3$ complex has a more reversible and weaker reduction process. This complexation sequence is supported by the different kind of CD spectra found in both titrations.

These different conformations could be due to a different chemical environment caused by an excess of free $Pb(II)$ in the bulk solution or to a very weak bond between them and the carboxylate groups still free in the $PbPC_3$ complex. This last hypothesis can not be confirmed either by CD or by DPP measurements because of the strong overlapping between the anodic signal related with the $PbPC_3$ complex and a possible signal of a Pb^{2+} -ion weakly bound previous to the signal of free Pb^{2+} (signal 3 and 1 in Fig. 1 and Fig. 5).

5. Conclusions

The complexation study of the $Pb(II)$ - PC_3 system by voltammetric titrations yields two sets of experimental data with an important lack of linearity because of the large potential shift of some signals. This feature indicates that these data can not be analysed by standard MCR-ALS. The prior use of *shiftfit* algorithm increases the linearity of the data, but preserving the original electrochemical information, and MCR-ALS is applied with a noticeable decrease in the lack of fit. Moreover, some ambiguities observed in the direct treatment of the experimental voltammetric data, which arise from the indistinctness in the shape of the DPP-signals, are solved by combining them with CD measurements for a simultaneous MCR-ALS analysis. The improvements in this approach come from the different sensitivities with respect to the chemical species of these techniques.

The overall picture of the study shows the presence of a 1 : 1 $Pb(II)$ - PC_3 complex that, depending of the metal-to-ligand ratio, can present two forms yielding two different CD spectra and a progressive potential shift (which causes a decrease in the data linearity). The reasons for the existence of both forms are unclear. However, in the presence of an excess of free $Pb(II)$, some conformational changes in the complex can occur and modify the binding strength of Pb , perhaps as a consequence of weak binding to the carboxylate groups of PC_3 .

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Educación y Ciencia (Project

CTQ2006-14385-C02-01). This research is a part of the activities of SIBA-TEQ group (project 2005SGR00186) from the Generalitat of Catalonia.

References

- 1 M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz and R. Tauler, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 49.
- 2 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2006, **25**, 86.
- 3 A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 112.
- 4 A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **584**, 403.
- 5 E. Grill, E. L. Winnacker and M. H. Zenk, *Science*, 1985, **230**, 674.
- 6 W. E. Rauser, *Annu. Rev. Biochem.*, 1990, **59**, 61.
- 7 M. H. Zenk, *Gene*, 1996, **179**, 21.
- 8 D. E. Salt and W. E. Rauser, *Plant Physiol.*, 1995, **107**, 1293.
- 9 S. C. Mc Cutcheon and J. L. Schnoor, *Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants*, John Wiley & Sons, 2003.
- 10 I. Raskin and B. D. Ensley, *Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment*, Wiley, New York, 2000.
- 11 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, I. Sestáková, J. Velek, C. Ariño and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 2002, **520**, 111.
- 12 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 778.
- 13 E. Chekmeneva, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Electroanalysis*, 2007, **19**, 310.
- 14 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban and R. Tauler, *J. Electroanal. Chem.*, 2001, **516**, 110.
- 15 A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Talanta*, 2007, **71**, 344.
- 16 M. Heyrovsky, P. Mader, V. Veselá and M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.*, 1994, **369**, 53.
- 17 J. M. Séquaris, *Compr. Anal. Chem.*, 1992, **27**, 115.
- 18 *Matlab version 7.3.0.267*, Mathworks Inc. Natick, MA, USA, 2006.
- 19 R. Tauler, A. Izquierdo-Ridora and E. Casassas, *Chemom. Intell. Lab. Syst.*, 1993, **18**, 293.
- 20 R. Tauler, A. K. Smilde and B. R. Kowalski, *J. Chemom.*, 1995, **9**, 31.
- 21 G. H. Golub and Ch. F. van Loan, *Matrix Computation*, Johns Hopkins University Press, Baltimore, MD, 1989.
- 22 W. Windig and J. Guilment, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1425.
- 23 R. K. Mehra, V. R. Kodati and R. Abdullah, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **215**, 730.

11.6 Comparative study of metal complexation by thiol-rich peptides using bismuth film and mercury drop electrodes

A. Alberich, N. Serrano, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban

Talanta 78 (2009) 1017-1022

En el último artículo que compone la tesis doctoral se estudia la complejación del sistema GSH-Pb(II) utilizando un electrodo de película de bismuto. La elección de este sistema se debe a la dificultad que supuso su análisis [1] en un electrodo de gotas de mercurio debido al extraordinario solapamiento de señales que presentaba; de hecho, sólo se pudo resolver -no sin ambigüedades- realizando las valoraciones a un valor de pH al cual el Pb(II) se encuentra parcialmente hidrolizado y, por tanto, su señal desplazada a potenciales más negativos, disminuyendo así su solapamiento con las señales anódicas.

La metodología que se sigue es la misma que hasta ahora, es decir, realizar valoraciones voltamperométricas y analizarlas mediante MCR-ALS, pero al no tener conocimiento del comportamiento electroquímico en un BiFE de cada una de las especies que participan en los procesos de complejación, se requiere un estudio preliminar de cada una de estas especies por separado. Este estudio previo sirve para observar qué especies originan señales y cuál es su posición y forma a fin de poder reconocerlas posteriormente en las valoraciones, así como también para encontrar las condiciones experimentales óptimas de estas valoraciones.

Entonces, se examina el sistema GSH-Pb(II) y se comparan los resultados obtenidos mediante polarografía (SMDE) y voltamperometría (BiFE), concluyendo que aunque existen señales anódicas asociadas al GSH libre y a la formación de sus complejos para ambos electrodos, el menor solapamiento alcanzado al utilizar un BiFE permite una mejor resolución del modelo de complejación.



Bismuth film electrodes for the study of metal thiolate complexation: An alternative to mercury electrodes

Arístides Alberich, 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 25 September 2008

Received in revised form 2 December 2008

Accepted 9 January 2009

Available online 20 January 2009

Keywords:

Heavy metals complexation
Phytochelatin
Bismuth film electrode (BiFE)
Signal splitting
Anodic signals

ABSTRACT

A comparative study of the usual static mercury drop electrode (SMDE) and the bismuth film electrode (BiFE) as applied to the analysis of metal complexation by thiol-rich peptides is done. Preliminary experiments on BiFE by differential pulse voltammetry showed that Cd(II) and Pb(II)-ions behave in a similar way as using stripping voltammetry and stripping chronopotentiometry with regard to some splitting effects of the signals. Additionally, on BiFE glutathione (GSH) and some phytochelatin (PC_n) produce quite irregular signals related to the anodic oxidation of bismuth, which restricted the studies to a narrower concentration range than on SMDE. In the presence of both metal ion and peptide the same characteristic signals were observed on BiFE and SMDE, but better resolution was achieved in the first one, allowing a qualitative analysis of the complexation process for the Pb–GSH system which was not possible on SMDE. This suggests that BiFE may be a complementary tool to Hg electrodes, if not a valuable alternative, in the study of metal complexation.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Bioaccumulation of heavy metals by chronic exposure can cause serious diseases and irreversible side effects to human beings. To avoid their entry in the food chain, ecosystems polluted with metals can be returned to their original condition using plants that synthesize peptides that sequester and remove metal ions [1]. Among these peptides, the oligomers of glutathione (GSH) named phytochelatin (PC_n) play a key role. With the generic structure $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, in which n generally ranges between 2 and 6, PC_n form complexes of extraordinary stability with metal ions mainly via thiolate coordination, although N- and C-terminus of free peptides could take part in important functions [2,3].

Sequence of formation of PC–metal complexes, their stoichiometries and the function of the different chelating groups have already been studied analyzing voltammetric titrations in Hg electrodes by multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS) [4,5]. This approach has proved to be useful for Cd(II) and Zn(II) complexes [6,7], but Pb(II)– PC_n systems present the problem that thiol facilitates the oxidation of the mercury of the electrode, producing many anodic signals that appear in the reduction region of Pb(II) [8]. These signals – provided by PC_n in its free form as well as complexed [4–9] – strongly overlap with the one of free Pb(II), making more difficult to achieve satisfactory results.

The use of electrodes based in other materials than mercury [10–12] offers the chance of minimizing the presence of anodic signals. Among the alternative electrodes, bismuth film electrode (BiFE) [13] presents the advantage of being environmentally friendly and nowadays is considered, from an electrochemical point of view, a good alternative to the prevalent use of mercury electrodes [14,15].

The present work evaluates the applicability of the methodology previously developed by using mercury electrodes in the study of the complexation of Pb(II) by PC_n and GSH using a bismuth film electrode instead. The expected improvements should come from a simplification of the electrochemical data, due either to a lower number of species providing signals or to a weaker signal overlapping. Recently, Cd(II)- or Zn(II)-cysteine side chain reduction signals in metallothioneins (MTs) were studied using Bi electrodes [16,17], but in these systems neither free metal nor anodic signals of free MTs appear. Due to this lack of previous knowledge, and in order to assign accurately every species to its corresponding signal in the subsequent voltammetric titrations, firstly we study one by one the electrochemical behavior of each chemical species involved in complexation process; then, the study of Pb–GSH (a system not satisfactorily solved using a mercury drop electrode) is carried out on BiFE.

2. Experimental

2.1. Chemicals

A standard Bi(III) solution ($996\ \mu\text{g mL}^{-1}$, atomic absorption standard solution) was purchased from Aldrich. Phytochelatin

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

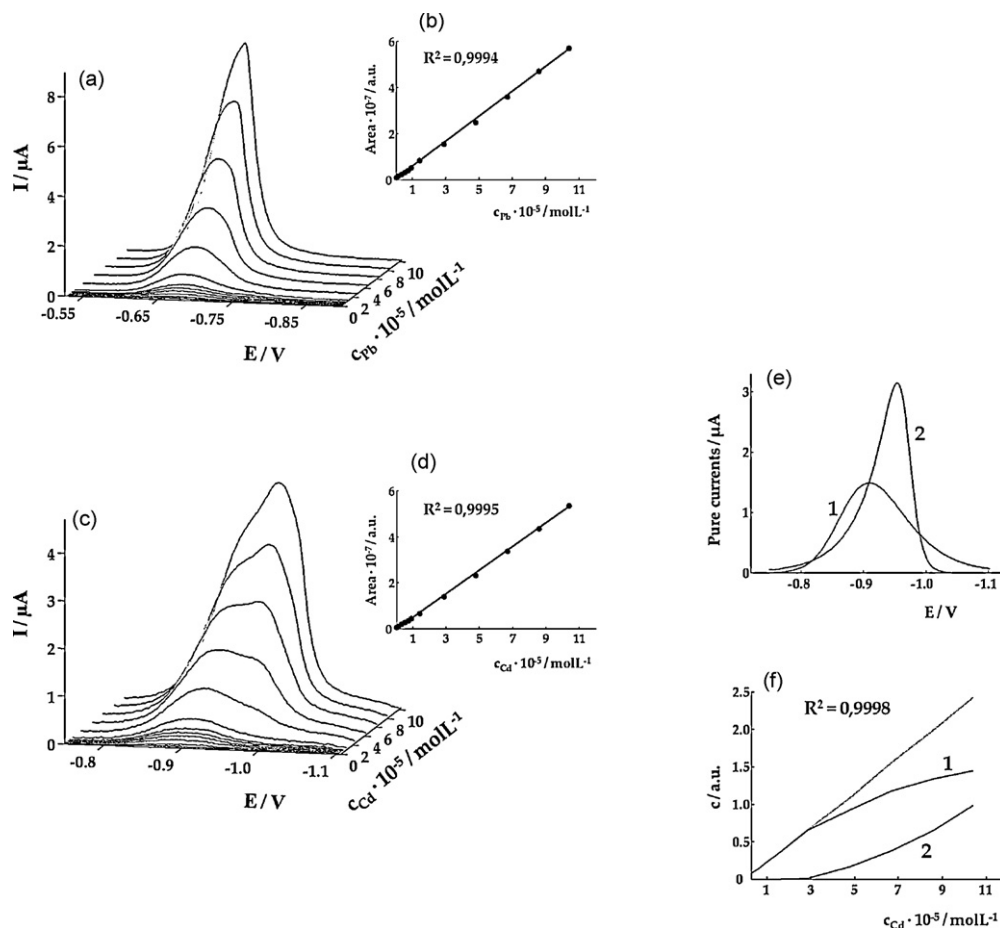


Fig. 1. Series of differential pulse voltammograms obtained for increasing concentrations of Pb(II) (a) and Cd(II) (c) at pH 6.4 in 0.01 mol L^{-1} maleic-maleate buffer and $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$ on BiFE with their resulting calibration plots (b) and (d), respectively. (e) and (f) correspond to the normalized pure signals and the concentration profiles, respectively, obtained in the MCR-ALS decomposition of data matrix shown in (c): (1) represents the component at less negative potential and (2) represents the component at more negative potential.

with $n=2-4$ were provided as trifluoroacetate salt by Diver-Drugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity of *ca.* 90% and Glutathione (GSH), in the reduced form, was provided by Merck with a purity greater than 99%. All other reagents used were Merck and Sigma/Aldrich analytical grade. Cd(II) and Pb(II) stock solutions $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ were prepared from $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ and $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, respectively, and standardized complexometrically. Maleic acid-KOH buffer solution was used for pH control and KNO_3 was employed as supporting electrolyte. Ultrapure water (Milli-Q plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

2.2. Apparatus and electrochemical parameters

Differential pulse voltammetric (DPV) measurements were performed on a static mercury drop electrode (SMDE, drop area 0.6 mm^2) using a 757VA Computrace (Metrohm) and on a bismuth film electrode (BiFE) using a Metrohm 663 VA Stand (Metrohm) attached to an Autolab System PGSTAT12 (EcoChemie).

The BiFE was prepared from a glassy carbon rotating disk electrode (RDE) of 2 mm diameter (Metrohm). The parameters used for were a pulse time of 50 ms, pulse amplitude of 50 mV, potential step of 2 mV and, in the case of SMDE, a drop time of 0.8 s. Note that DPV in SMDE is in fact differential pulse polarography (DPP).

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

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

2.3. Ex situ preparation of the bismuth film on the BiFE-RDE

The RDE was polished using a suspension of alumina particles of 300 nm diameter, and then rinsed with deionized water and sonicated in absolute ethanol and deionized water. After that, three 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, $E_d = -0.60 \text{ V}$ was applied for 300 s with a RDE rotation speed of 500 rpm, followed by a rest period (without rotation) of 20 s. Once bismuth was deposited as a film, all electrodes were rinsed with water and the Bi(III) solution was replaced in the cell by the one to be measured.

2.4. Procedures

Measurements of free metals or ligands started by placing in the cell 20 mL of 0.01 mol L^{-1} maleic/maleate buffer (pH 6.4) and $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. Then, the sample was deaerated with pure nitrogen for 20 min and a blank scan was recorded. Further, aliquots of metal or ligand solutions were added and the respective curves were recorded.

In voltammetric titrations of Pb(II) with ligands, 20 mL of a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution were placed into the cell and purged

with nitrogen for 20 min. DPV curves were then recorded. After recording reproducible curves, aliquots containing $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ of ligand solution were added and the respective DPV curves recorded. After every addition, solutions were purged and mechanically stirred for 1 min. Titrations were also performed in the opposite way: 20 mL of a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ligand solution were titrated with a $8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution following the same procedure.

3. Results and discussion

3.1. Study of the signals observed on a BiFE in the presence of metal-thiolate

3.1.1. Reduction signal of free metal ions

In a previous work, the electrochemical behavior of different metal ions was studied by stripping techniques on a BiFE [18]. Some splitting of the oxidation signals was observed, which depended on the metal (its solubility in Bi), the concentration and the deposition parameters. However, splitting did not hinder the possibility of quantitative analysis or the application of MCR-ALS, since the total area was still linear with respect to metal concentration.

Here, the behavior of some free metal ions by DPV, the technique commonly used for complexation studies, is checked. Pb(II) and Cd(II) have been considered as examples of metals whose solubility in bismuth is relatively high and quite low, respectively [19].

In the case of Pb(II) only one peak is observed in all the range considered (Fig. 1a), whereas Cd(II) presents an unique or two overlapping peaks depending on the metal concentration range (Fig. 1c), which is in agreement with the experiments done by stripping techniques in the aforementioned work [18]. Now, for both metals, the total area of voltammograms is again linear with the metal concentration over the range 5×10^{-7} to $1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$ (Fig. 1b and d). It must be noted that the area under a DPV signal is a pure operational parameter, since pulse potential and potential step are not coincident, and this is why arbitrary units are given to that. Anyway, this area is expected to be proportional to the current that would be measured in a more "direct" technique like direct current (DC) voltammetry.

With regards to the MCR-ALS application to subsequent voltammetric titrations with ligands, this split of the free metal signal would be assumed with two components – referred to the same chemical species (Fig. 1e) – given that the sum of their concentration profiles is again linear with cadmium concentration (Fig. 1f, dashed line). The MCR-ALS analysis of the experimental data matrix (lack of fit 5.3%) has been carried out with constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal-shape

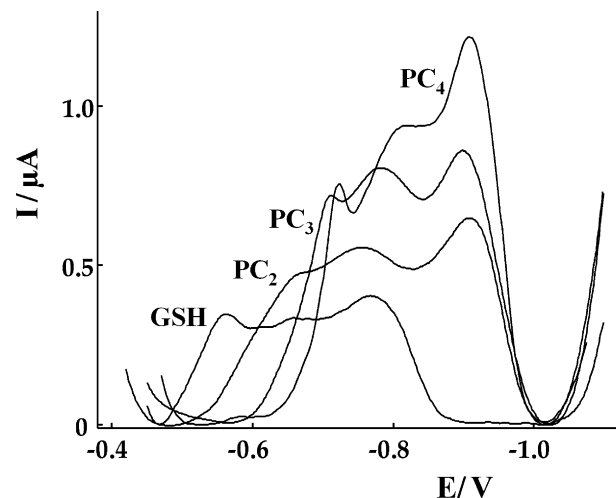


Fig. 2. Differential pulse voltammograms of a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ GSH and different phytochelatin solutions (PC_2 , PC_3 and PC_4) measured at pH 6.4 in 0.01 mol L^{-1} maleic-maleate buffer and 0.05 mol L^{-1} KNO_3 on BiFE.

for both components. From a qualitative point of view, this behavior is similar to that observed when analyzing free Cd(II)-ion by means of stripping voltammetry and stripping chronopotentiometry [18], where two peaks were observed and where successive additions of Cd(II)-ion produced first an increase of the peak at less negative potentials and, at higher concentration, a stabilization of this signal followed by a progressive increase of the signal at more negative potentials.

3.1.2. Signals of free ligands

To analyze the signals related with anodic oxidation of the electrode material when PC_n and GSH are present, voltammograms of different peptide solutions were measured (Fig. 2). Signals of the ligands in their free form extend over a large potential range and lack of the typical DP-shape. Moreover, the current values increase with the number of thiol groups of the peptide, maybe due to a higher adsorption onto BiFE, as the presence of the characteristic peak-counterpeak shape in elimination voltammetry with linear scan (EVLS) measurements suggests (data not shown) [20,21]. The complex shape of these signals contrasts with those obtained using a mercury electrode [8,22] and could represent an additional difficulty in the further MCR-ALS analysis of data matrices [4].

In order to go into the behavior of these signals, DPV measurements of increasing GSH concentrations were made on SMDE (Fig. 3a) and BiFE (Fig. 3c). In both experiments the shapes of the sig-

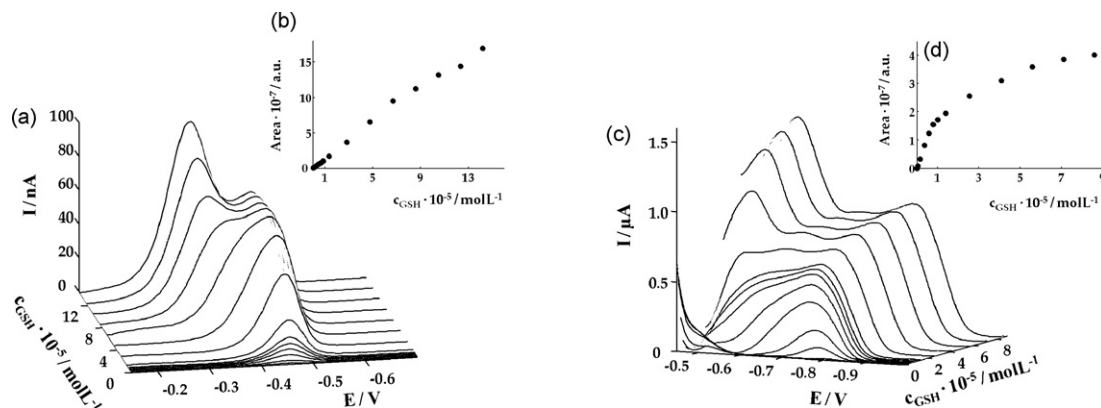


Fig. 3. Differential pulse voltammograms obtained for increasing concentrations of GSH on SMDE (a) and BiFE (c) at pH 6.4 in 0.01 mol L^{-1} maleic-maleate buffer and 0.05 mol L^{-1} KNO_3 with their resulting calibration plots (b) and (d), respectively.

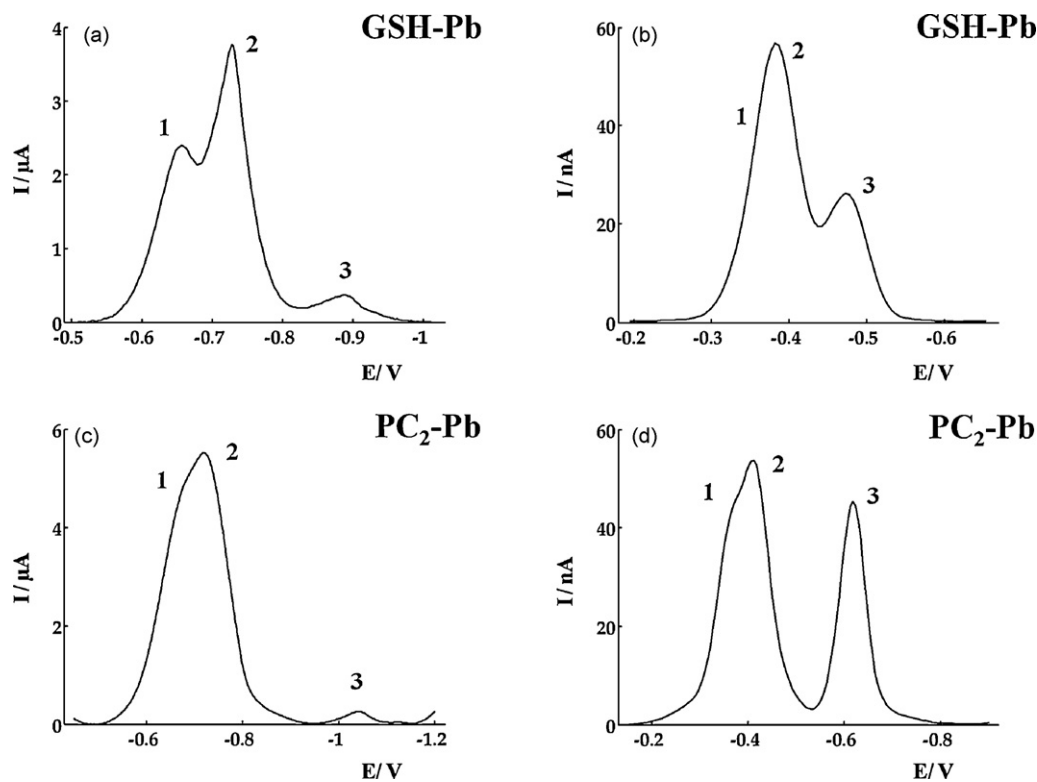


Fig. 4. Differential pulse voltammograms of a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1} \text{ Pb(II)}$ solution in the presence of GSH or PC_2 , at the ligand-to-metal ratios of 1.5:1, measured on BiFE (a, c) and SMDE (b, d) at pH 6.4 in 0.01 mol L^{-1} maleic-maleate buffer and $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$.

nals change with GSH concentration, but there are some important differences between them. In SMDE, the shape change (respect to a simple peak) takes place at high concentrations, while for BiFE, the evolution of the GSH signal is quite intricate during all the concentrations range. Regarding linearity between the total peak areas and GSH concentration, it is fulfilled inside the full range on SMDE, but only at low GSH concentrations on BiFE (Fig. 3b and d, respectively). This would prevent MCR-ALS application to BiFE data because of the appearance of additional components without electrochemical meaning, unless voltammetric titrations are carried out in the proper GSH concentration range (where changes in the anodic signal are less pronounced and linearity is still observed): 2×10^{-7} to $7.5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ GSH.

3.1.3. Signals of the Pb-thiolate complexes

In order to analyze the signals concerning complexation, additions of Pb(II) over GSH or PC_n ($n=2-4$) solutions – and *vice versa* – have been carried out on BiFE and SMDE. Fig. 4 shows, as example of these experiments, the voltammograms obtained at ligand-to-metal ratio 1.5:1. At this ratio the formation of 1:2 Pb:GSH and 1:1 Pb: PC_2 complexes are reached completely – as previous studies in mercury electrodes confirmed [8,22] – and, therefore, some of the Pb(II) added remains as free cation.

The analysis of the different experiments suggests some general conclusions that can be visualized in Fig. 4: (i) in both electrodes, all systems provide the reduction signal of the complex (signal 3) and the signal related with the anodic oxidation of the electrode material (signal 1) which overlaps with the signal of free Pb(II) (signal 2); (ii) for BiFE the separation between signals 1 and 2 varies with the complex formed, and for SMDE it is relatively fixed; (iii) separation between signals 3 and 2 is larger on BiFE than on SMDE; (iv) comparing the heights of signal 3, it can be noticed that the reduction process of the complexes presents a marked electrochemically inert character on BiFE (reduction is faster than association-dissociation

of the complex) which prevents us from doing experiments with initial concentrations of metal or ligand below $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

To conclude this preliminary study, we can state that all the signals produced on SMDE by the species involved in the complexation of Pb(II) by PC_n or GSH are also present on BiFE, where some of these signals become less important or undergo a weaker overlapping. In addition, due to the low sensitivity of BiFE regarding the reduction signal of complexes, voltammetric titrations have to be done at a minimum initial concentration of metal or ligand of $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, a range of concentrations where the shape of free ligand signals dramatically changes and can undergo an important loss of linearity, hindering a correct application of MCR-ALS.

3.2. Study of the Pb(II)–GSH system on BiFE

Fig. 5 shows the evolution of the voltammograms corresponding to a titration of GSH with Pb(II) measured in both electrodes. Confirming our previous experience [8], experimental data on SMDE (Fig. 5a) show a very strong overlapping between the signal of free GSH (signal 3) and its complex (signal 4), in such a way that a slight shift between them is noticed but their evolution is very uncertain. Still more indistinguishable are the anodic signal related with the complex formation (signal 1) and the reduction of free Pb(II) ion (signal 2). These facts hinder any reliable proposal of a complexation sequence, from both a MCR-ALS and qualitative visual analysis of voltammograms evolution. In fact, to avoid the nearly complete overlapping between signals, Pb(II)–GSH system was already studied [23] at more extreme pH conditions where free Pb(II) ion were partially hydrolyzed, and therefore its peak potential shifted.

In contrast with SMDE, titration on BiFE (Fig. 5b) shows a much weaker overlapping of signals (1)–(2) and (3)–(4) allowing us to achieve good results from a qualitative viewpoint, since MCR-ALS cannot be applied for GSH case due, as it has been reasoned before, to the lack of linearity between the concentration of free GSH and

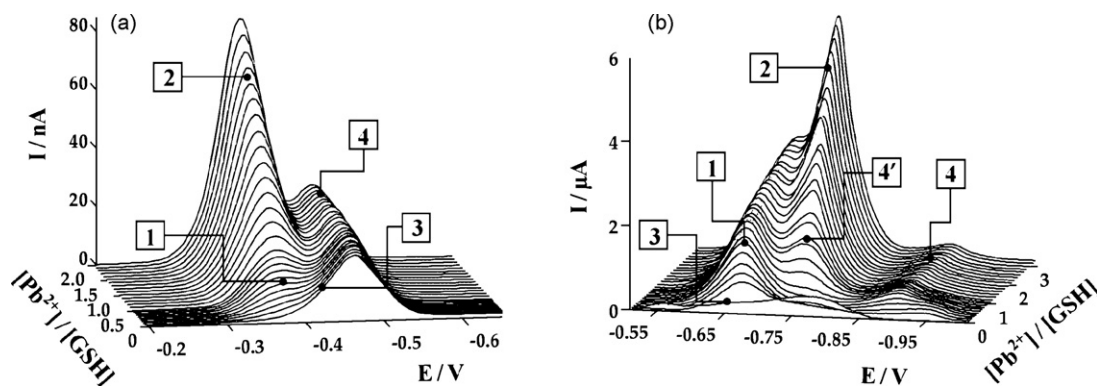


Fig. 5. Experimental data matrix containing the differential pulse voltammograms measured for a $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Pb(II) solution when titrated with GSH on SMDE (a) and BiFE (b) at pH 6.4 in 0.01 mol L^{-1} maleic-maleate buffer and $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. Signals are due to: anodic of $\text{Pb}(\text{GSH})_2$ (1), Pb^{2+} -ion (2), GSH (3), reduction of $\text{Pb}(\text{GSH})_2$ (4) and $\text{Pb}_2(\text{GSH})_2$ (4').

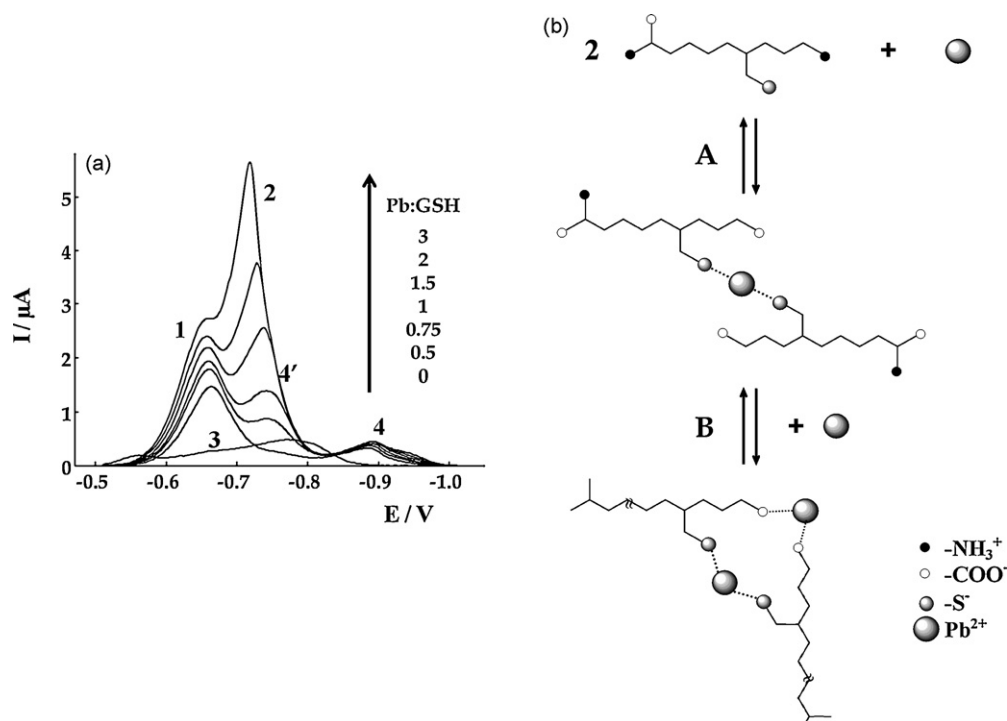


Fig. 6. Selected differential pulse voltammograms from Fig. 5b with the metal-to-ligand ratios marked as inset (a) and the complexation sequence inferred (b).

its signals. Furthermore, different Pb(II) bonds are well established – signals 4 and 4' – which supports BiFE as a suitable alternative to mercury electrodes in speciation studies.

The evolution of this titration can be seen in Fig. 6a – where the chosen values of metal-to-ligand ratio are specified – and its qualitative study allows us to propose a complexation sequence shown in Fig. 6b. At the beginning of the titration, only the anodic signal related to free GSH (signal 3) is observed. When Pb(II) is added over the large excess of GSH, it forms very stable bonds with two thiol groups, as the increase of signal 4 (at *ca.* -0.88 V) until a maximum ratio of 0.5 (two peptides per metal) indicates. Moreover, an anodic signal associated to the formation of this 1:2 Pb:GSH complex (signal 1, at *ca.* -0.67 V) appears and free GSH signal seems to disappear, although its evolution is unclear due to the constant changes that this signal undergoes (as Fig. 3c showed). This $\text{Pb}(\text{GSH})_2$ complex is electrochemically inert (redox process is faster than equilibrium A) since its signal holds at a fixed potential.

As the M:L ratio increases, signals 1 and 4 associated with $\text{Pb}(\text{GSH})_2$ complex stabilize and free metal appears (signal 2).

During its increase we can observe a noticeable shift towards less negative potentials from *ca.* metal-to-ligand ratio 1, indicating that a fraction of the Pb(II) added would be weakly bound to GSH, probably to carboxylate groups (signal 4') that are still free in the complex already formed. This $\text{Pb}_2(\text{GSH})_2$ complex seems to be electrochemically labile (equilibrium B dissociates inside the DPV time-window) as signal 2 moving towards more positive potentials on the free Pb(II) addition indicates.

4. Conclusions

It can be concluded that BiFE is a good alternative to Hg electrodes for complexation studies in the presence of thiol-rich peptides, since measures provide the same type of signals for both electrodes, and therefore, similar or even complementary information could be extracted. Moreover, some good features of mercury electrodes as the low concentration of ligands closer to the real one in cells and the strong dependence of the signals on the metal speci-

ation are maintained using bismuth electrode, with the important benefit of being non-toxic.

Certainly, MCR-ALS cannot be applied for complexation studies of GSH and PC_n on BiFE, due to the electrochemically inert character of their complexes and the loss of linearity of the free ligand signals. However, this does not mean necessarily the inapplicability of MCR-ALS in complexation studies of heavy metals by other ligands of biological or environmental interest on BiFE. On the other hand, the low sensitivity of BiFE with respect to the reduction signal of complexes can simplify the voltammograms in the study of the evolution of the free metal signal, although it can also make more difficult the direct study of the evolution of every complex through its signal.

Finally, some Pb(II)-thiolate systems that present an excessive signal overlapping in mercury electrodes can be solved using a BiFE. Thus, Pb(II)-GSH system has been analyzed and a complexation sequence proposed, which can help to understand the role of low molecular weight PC-related thiols in the heavy metal detoxification procedures.

Acknowledgements

The authors acknowledge support of the Spanish Ministry of Education and Science (project CTQ2006-14385-C02-01/BQU). This research is part of the activities of SIBA-TEQ group, which is recognized as consolidated group by the Generalitat of Catalonia (2005SGR00186).

References

- [1] M. Mejare, L. Bulow, *Trends Biotechnol.* 19 (2001) 67.
- [2] E. Grill, E.L. Winnacker, M.H. Zenk, *Science* 230 (1985) 674.
- [3] M.H. Zenk, *Gene* 179 (1996) 21.
- [4] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [5] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86.
- [6] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2860.
- [7] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 778.
- [8] A. Alberich, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Talanta* 71 (2007) 344.
- [9] M. Heyrovsky, P. Mader, V. Veselá, M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.* 369 (1994) 53.
- [10] J. Wang, *Stripping Analysis: Principles, Instrumentation and Applications*, VCH, Deerfield Beach, FL, 1985.
- [11] B. Yosypchuk, L. Novotný, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 32 (2002) 141.
- [12] E.P. Achterberg, C. Braungardt, *Anal. Chim. Acta* 400 (1999) 381.
- [13] J. Wang, J. Lu, S.B. Hocevar, P.A.M. Farias, B. Ogorevc, *Anal. Chem.* 72 (2000) 3218.
- [14] J. Wang, *Electroanalysis* 17 (2005) 1341.
- [15] A. Economou, *Trends Anal. Chem.* 24 (2005) 334.
- [16] M. Yang, Z. Zhang, Z. Hu, J. Li, *Talanta* 69 (2006) 1162.
- [17] M. Xu, Y. Wu, J. Wang, F. Zhou, *Electroanalysis* 18 (2006) 2099.
- [18] N. Serrano, A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electrochim. Acta* 53 (2008) 6616.
- [19] ASM Handbook, 10th ed., vol. 3, Alloy phase diagrams Section 2, Ohio, USA, 1992.
- [20] O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.* 402 (1996) 19.
- [21] L. Trnkova, O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.* 413 (1996) 123.
- [22] J.M. Séquaris, *Compr. Anal. Chem.* 27 (1992) 115.
- [23] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *J. Electroanal. Chem.* 516 (2001) 110.

12

Discusión de resultados

12.1. Problemas del estudio MCR-ALS de valoraciones PC/Pb(II) utilizando un SMDE

A lo largo de la presente tesis, cuando se ha realizado una valoración en un electrodo de gotas de mercurio entre un ligando con grupos tiol y Pb(II), se han observado una serie de fenómenos:

- i)* Una vez formados algunos complejos, sus señales se desplazan lenta pero continuamente a potenciales más negativos conforme se añade Pb(II). Este comportamiento se ha visto en todos los sistemas estudiados, como los fragmentos del glutatión y la PC₂ (artículo 11.1), la PC₃ (11.1 y 11.5) y el GSH (11.6), y se puede comprobar, por ejemplo, en la figura 1d del primero de ellos.
- ii)* La existencia de señales anódicas asociadas a la oxidación del mercurio (siempre con mayor prodigalidad en valoraciones directas) que cambian fácilmente de forma y sufren significativos desplazamientos laterales.
- iii)* Un fuerte solapamiento de las señales anódicas con el resto de señales que conforman las valoraciones. En casos extremos, como el de la figura 1a mostrada a continuación, en apenas 200 mV se originan señales pertenecientes a, al menos, cinco especies químicas distintas.

Los dos primeros fenómenos impiden la obtención de matrices de datos que respeten la condición de bilinealidad -y, recordémoslo, es condición necesaria para la aplicación de cualquier método MCR- de forma que se puede perder la concordancia entre componente y proceso electroquímico y, generalmente, esto quiere decir también entre componente y especie química. En la figura Ib se aprecia como algunos componentes estimados por SVD no explican apenas la variabilidad de las medidas.

De todas formas, en lo referente a la presencia de señales anódicas, es necesario aclarar que a bajas concentraciones la señal originada por el ligando libre suele tener un comportamiento reversible y la información que proporciona es tan valiosa como la de cualquier otra especie; sin embargo, no ocurre lo mismo a altas concentraciones ni con las señales anódicas asociadas a los complejos, cuyo comportamiento electroquímico es impredecible. Esto se puede observar especialmente en la figura 1 (I_{exp}) del artículo 11.5 y en la figura 3a del 11.6.

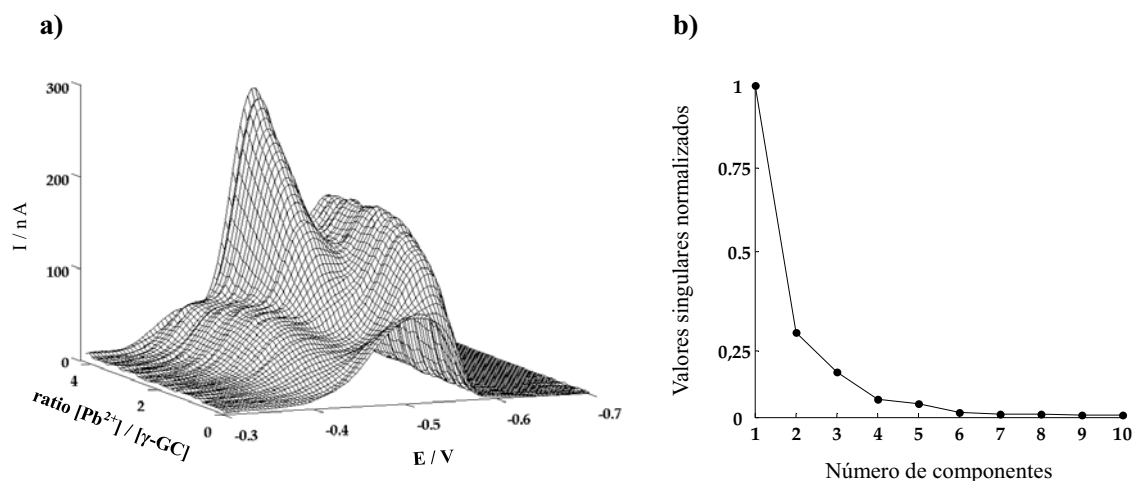


Figura I. (a) Matriz de la valoración inversa del sistema γ -Glu-Cys/Pb(II). (b) Estimación del número de componentes para la matriz de la valoración directa del sistema PC_3 /Pb(II). Las condiciones experimentales para ambas valoraciones son las indicadas en el artículo 11.1.

En cuanto al punto *iii*), el análisis MCR-ALS de matrices polarográficas también se complica cuando existe solapamiento entre señales, pues si éste es muy grande los perfiles puros de las especies implicadas no quedan bien resueltos y no se puede establecer con seguridad la estequiometría de los complejos formados.

Estos problemas se pusieron de manifiesto en el primer artículo (11.1), en el cual nos centraremos ahora explicando los resultados obtenidos para cada sistema estudiado.

Sistema Cys-Gly / Pb(II)

Por ser éste el primer sistema presentado, nos extenderemos algo más en el proceso de modelado blando y estudio de la valoración inversa, cuya matriz podemos ver en la figura 1a del artículo. La asignación de señales al tipo de especie química (metal o ligando libres, complejos, anódicas) resulta casi siempre fácil debido a la experiencia acumulada en nuestro grupo de investigación, a la forma de pico de las señales y, obviamente, al seguimiento visual efectuado durante la valoración. De todas formas, conocer el número de componentes que explican la variabilidad de la matriz resulta también una orientación importante; en este caso, la descomposición en valores singulares (SVD) sugiere la existencia de cuatro componentes pero, como se acaba de decir, el método es orientativo, pues con frecuencia algunas señales tienen un comportamiento semejante (al menos en algún segmento de la valoración) con lo que sus contribuciones a la variación de las medidas es menor, es decir, SVD no considera dos componentes para dos procesos redox diferentes.

Lo más llamativo de esta matriz es el desplazamiento progresivo hacia potenciales más negativos que experimenta la señal del complejo una vez que alcanza su intensidad máxima (fig. 1d). Este desplazamiento es tan grande que si en el análisis MCR-ALS no se consideran dos componentes diferentes para la misma señal (uno para la formación del complejo y otro para su desplazamiento), los resultados obtenidos no son congruentes y el error asociado a la factorización de \mathbf{I} excesivo. Así pues, se realiza un análisis de cinco componentes en el cual no se aplica la restricción de forma a la señal del complejo para que incluya parte del movimiento de su señal anódica asociada, consiguiendo así simplificar las matrices \mathbf{C} y \mathbf{V}^T a cambio de un pequeño aumento del error respecto al mismo tipo de análisis con un componente más. Por supuesto, antes de admitir la ausencia de forma para cualquier componente se comprueba que no afecta sensiblemente a ningún voltamperograma unitario ni perfil de concentración.

En el análisis de las matrices resultantes (figuras 1b y 1c), parece clara la formación de un complejo $\text{Pb}(\text{CG})_2$ pues el perfil de concentración del componente 4 crece hasta ratio $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{CG}]$ 0,5 y luego se estabiliza, toda vez que desaparece la señal de ligando

libre (componente 3) y aparece el ion Pb^{2+} (2). Observando la matriz \mathbf{V}^T , podemos concluir que el enlace S-Pb-S del complejo $\text{Pb}(\text{CG})_2$ es muy fuerte, a tenor del desplazamiento que presenta el Pb(II) complejado con respecto a su señal como ion libre.

Sin embargo, el desplazamiento de la señal (componente 5) no presenta una estequiometría definida y, de hecho, tampoco significado químico como complejo, pues a ratio 0,5 todos los tioles están coordinados como $\text{Pb}(\text{CG})_2$ y el plomo añadido ya aparece como ion libre.

Para intentar responder a esta incógnita estudiamos la valoración directa (fig. 2), en cuya matriz se vuelve a observar un desplazamiento de la señal del complejo, pero esta vez desde el principio de la valoración (fig. 2d). Este comportamiento nos hace pensar en dos complejos consecutivos, probablemente de estequiometrías $\text{Pb}^{2+}:\text{CG}$ 1:1 y 1:2, hipótesis que se comprueba aplicando la restricción de equilibrio al metal libre y los dos posibles complejos (componentes 2, 4 y 5, respectivamente). El resultado es satisfactorio, como se aprecia en las matrices \mathbf{C} y \mathbf{V}^T , y se confirma la formación de los dos complejos propuestos, el $\text{Pb}(\text{CG})$ con constante de estabilidad $\beta_1 = 6,10 \pm 0,02$ y el $\text{Pb}(\text{CG})_2$ con constante de estabilidad $\beta_2 = 11,19 \pm 0,03$ (tabla 1).

Los resultados de la valoración directa no confirman que el componente 5 de la inversa sea un complejo Pb:CG 1:1, pues parece poco verosímil que un enlace Pb-Cys surja a un potencial más negativo que un enlace Cys-Pb-Cys. Asimismo, el estudio de la matriz aumentada que contiene ambas valoraciones tampoco produce buenos resultados pues, una vez correlacionados los potenciales del plomo libre, el complejo $\text{Pb}(\text{CG})$ no coincide con el componente 5. Así pues, finalmente no se pudo dar una explicación concreta para el desplazamiento del complejo $\text{Pb}(\text{CG})_2$ durante la valoración inversa.

Sistema $\gamma\text{-Glu-Cys} / \text{Pb(II)}$

Las matrices de ambas valoraciones son cualitativamente semejantes a las del sistema Cys-Gly/Pb(II), salvo que los complejos formados por el $\gamma\text{-Glu-Cys}$ (tanto con el plomo como con el mercurio) parecen ser más débiles y surgen a potenciales menos negativos. Esto conlleva que al solapamiento de las señales anódicas asociadas a la formación de complejos con el plomo libre se suma la del ligando libre y la de los complejos (fig. 1a).

Por esta razón, y aunque se intuyen resultados análogos a los del fragmento Cys-Gly, la distorsión de los perfiles de concentración de todas las especies no permite llegar a resultados concluyentes.

Sistema $PC_3 / Pb(II)$

La valoración inversa presenta una matriz de 5 componentes (fig. 3) con un importante solapamiento tanto entre el ligando libre (componente 4) y el primer complejo formado (5), como entre el Pb(II) libre (2) y las dos señales que le acompañan al final de la valoración (1 y 3), a pesar de lo cual se ha podido resolver satisfactoriamente con un error moderado del 7,4 %.

Al principio de la valoración se forma un complejo muy estable de estequiometría 1:1, como demuestran el perfil de concentración de dicho complejo que crece hasta valores de ratio $[Pb^{2+}]/[PC_3]$ igual a 1 y la desaparición de la señal anódica de la PC_3 libre según la proyección de la parte inicial de su perfil, proyección necesaria debido al alto solapamiento con el susodicho complejo. Hay que advertir que al componente 5 no se le ha aplicado la restricción de forma para que incluya las pequeñas señales anódicas que se originan con su formación, sin que ello suponga ninguna variación apreciable en las matrices V^T o C . Para este complejo $Pb(PC_3)$ se propone la estructura recogida en la Tabla 1, donde el Pb(II) está enlazado con dos grupos tiol debido al potencial tan negativo que presenta respecto al plomo libre; no se propone un enlace del Pb(II) a los tres grupos tiol porque es un número de coordinación que no se ha visto en la bibliografía [11].

A partir de ratio 1 aparecen dos nuevas señales, el componente 3 situado a un valor de potencial 60 mV más negativo que el plomo libre, por lo que probablemente se trate de un segundo complejo, y el componente 1 situado 70 mV menos negativos que el ion Pb^{2+} y con una evolución similar al componente 3, por lo que probablemente se trate de su señal anódica asociada. La estequiometría de este nuevo complejo no resulta fácil de determinar pues, por una parte, el perfil del plomo añadido indica que éste se encuentra como ión libre a partir de ratio 2, pero el perfil de concentración del componente 3 crece hasta casi ratio 3. Finalmente se concluye que este nuevo complejo es un M_2L , es decir, un $Pb_2(PC_3)$ donde el segundo metal estaría enlazado a un solo grupo tiol, por lo que su potencial es mucho menos negativo (su enlace es menos fuerte) que el del ión plomo

enlazado a dos grupos tiol (tabla 1). Esta resolución se asienta en el perfil del Pb(II) libre, en que el componente 5 se estabiliza a partir de ratio 1 -lo que quiere decir que el enlace S-Pb-S no se destruye-, y a que tanto el perfil del componente 3 como del 1 resultan engañosos pues la intensidad de sus señales se ven aumentadas por ser el hombro y la barriga, respectivamente, de una señal creciente a la que están fuertemente solapadas.

La matriz de la valoración directa resulta más complicada de analizar debido al gran número de señales anódicas que contiene y a que su posición y forma varían durante la valoración hasta perderse totalmente cualquier apariencia de línea base (fig. 4), aunque esto último es más obvio en la matriz experimental, es decir, en la matriz a la cual no se ha aplicado ninguna corrección ni suavizado. De hecho, el análisis propuesto contiene tres señales anódicas: la primera (componente 2) está claramente asociada a la formación de un complejo (5) y se solapa fuertemente con la señal del plomo libre (3); las otras dos señales anódicas (1 y 4) están relacionadas con la aparición de la PC₃ libre, aunque sólo se tiene en cuenta la última de ellas para analizar los perfiles de concentración, pues es la que guarda parámetros de reversibilidad más evidentes. Aún así, el voltamperograma unitario del complejo contiene dos señales anódicas más -si bien no de excesiva importancia- si no se restringe la forma de su señal.

El relato de un proceso de complejación para esta valoración no resulta fácil debido a la abundancia y solapamiento de las señales anódicas que provoca la alteración de todos los perfiles de concentración. Se propone la formación de un complejo Pb:PC₃ 1:1 por la posición de su voltamperograma unitario (claramente perteneciente a un enlace con dos restos de cisteína) y porque los perfiles de concentración tanto del plomo libre como de la PC₃ libre tienden a ratio $[PC_3]/[Pb^{2+}]$ 1. El hecho de que el perfil del complejo (5) crezca hasta ratio 1,5 -aparte de no tener sentido químico- se debe al solapamiento tan extremo, en este caso apenas existen 15-20 mV, entre la señal de la PC₃ libre y del complejo.

La formación de otro tipo de complejos con varios enlaces S-Pb-S equivalentes (como un M₂L donde cada plomo estaría enlazado a un grupo tiol terminal y compartirían el del medio) resultan más improbables, pues los perfiles de concentración de las diferentes especies debería desaparecer, estabilizarse o surgir a ratio $[PC_3]/[Pb^{2+}]$ 0,5.

Sistema PC₂ / Pb(II)

Las matrices del sistema PC₂/Pb(II) son cualitativamente iguales que las del sistema anteriormente explicado (fig. 5) aunque con algunas dificultades añadidas, por lo que el análisis quimiométrico realizado (número de componentes, restricciones aplicadas) es el mismo. Dichas dificultades en la valoración de la PC₂ con Pb(II) son: *i*) el solapamiento entre la señal del ligando libre (componente 4) y el primer complejo formado (5) es más fuerte, distorsionando considerablemente el perfil de concentración de la PC₂ libre; *ii*) tanto en el sistema anterior como en éste, el ion Pb²⁺ (2) surge a un potencial donde ya existen pequeñas señales anódicas relacionadas con la formación del primer complejo (5), señales anódicas incluidas en el voltamperograma unitario del complejo Pb(PC₃) pero no en el actual (comparar matrices V^T en figuras 3 y 5), por lo que el Pb(II) libre parece surgir mucho antes que lo que realmente indica la proyección del final de su perfil de concentración; *iii*) en ambos sistemas la señal del primer complejo sufre un continuo desplazamiento lateral, pero en el sistema PC₂/Pb(II) este movimiento es mayor, de tal forma que necesitaría dos componentes en el análisis quimiométrico para ser explicado correctamente.

El análisis de las matrices C y V^T parece indicar que al principio de la valoración, cuando el exceso de PC₂ es grande, cada ion plomo añadido se enlaza a dos grupos tiol formando un complejo muy estable Pb(PC₂). Sin embargo, al aproximarse a valores de ratio $[Pb^{2+}]/[PC_2]$ 1 y, por lo tanto, al disminuir el número de grupos tiol libres, algunos iones Pb²⁺ se enlazan con un solo grupo tiol, surgiendo la señal del complejo Pb₂(PC₂) y su anódica asociada (componente 3 y 1, respectivamente). Este segundo complejo no se forma en detrimento del primero, es decir, que al ir adicionando solución de Pb(II) el enlace S-Pb-S no se rompe sino que simplemente el complejo Pb₂(PC₂) se forma hasta agotar los grupos funcionales tiol libres y, probablemente, en algún intervalo de la valoración se generan ambos complejos a la vez. Por último, la proyección del perfil del plomo indica que este surge libre a ratio aproximadamente 1,2, lo que da idea de la poca extensión con la que se forma el complejo Pb₂(PC₂).

En cuanto a la valoración directa, parece que se forma tan sólo el complejo Pb(PC₂) y, como anteriormente para el sistema PC₃/Pb(II), tampoco se obtienen enlaces con una sola cisteína. Sin embargo, la abundancia y solapamiento de señales anódicas impide un análisis preciso de los resultados obtenidos por MCR-ALS.

12.2. Nuevas herramientas y metodologías: exposición y aplicación a sistemas con Cd(II) y Zn(II)

Si alguna conclusión general se puede extraer del artículo anterior en el cual tantas dudas quedan sin resolver es, precisamente, que la metodología basada en realizar valoraciones polarográficas y analizarlas mediante MCR-ALS no proporciona unos resultados tan satisfactorios como los obtenidos al estudiar la complejación de los mismos ligandos con Cd(II) o Zn(II). En estos sistemas ya se habían observado algunos de los fenómenos resumidos al principio del punto 12.1, aunque no supusieron un inconveniente para llegar a buenos resultados pues, por una parte, el desplazamiento lateral de las señales era más pequeño y se podía asimilar a un único componente y, por otro, se podía prescindir de la presencia de las señales anódicas por originarse a potenciales alejados del resto de señales.

Durante el resto de la tesis doctoral se exploran nuevas metodologías o herramientas que nos ayuden a moderar el impacto de los problemas vistos en el artículo 11.1, aplicándolas primero a sistemas sencillos y después a algún sistema con Pb(II) como metal valorante. En este capítulo 12.2 se recoge la primera parte, la exposición de dichas metodologías y su aplicación a sistemas con Cd(II) o Zn(II).

12.2.1. Análisis MCR-ALS de matrices espectro-voltamperométricas

La necesidad de conocer qué provoca el desplazamiento lateral de algunas señales se debe a que, frecuentemente, al faltar un componente que intente explicar dicho desplazamiento, los resultados del análisis MCR-ALS son insuficientes para determinar un proceso de complejación correcto.

Recordemos, por ejemplo, la valoración inversa del sistema $PC_2/Pb(II)$ recién vista en el artículo 11.1. Si consideramos el mismo tipo de análisis pero con un componente adicional (componente 6) para el desplazamiento lateral que sufría la señal del complejo $Pb(PC_2)$, los resultados mejoran notablemente. Las matrices V^T de ambos análisis (fig. II y fig. 5 del artículo 11.1) parecen prácticamente iguales, pero el hecho de añadir un componente resitúa ligeramente los voltamperogramas unitarios del complejo (5) y el ligando libre (4), de forma que en la matriz C sus perfiles de concentración son ahora sustancialmente diferentes, mientras que el resto de perfiles no se ven modificados.

No volveremos a hacer el análisis de los resultados, pero sí advertir que ahora explican de forma correcta el proceso de complejación allí descrito por comparación con el sistema $\text{PC}_3/\text{Pb(II)}$.

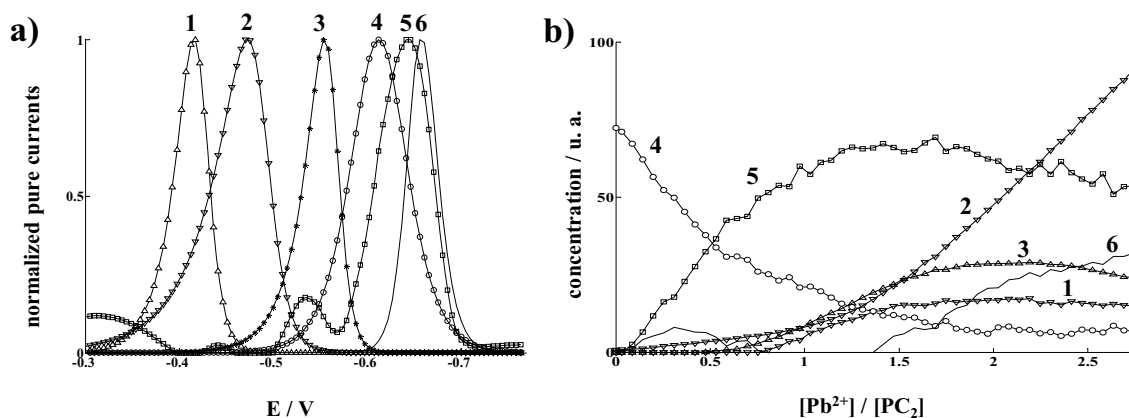


Figura II. Voltamperogramas unitarios normalizados (a) y perfiles de concentración (b) obtenidos mediante el análisis MCR-ALS del sistema $\text{PC}_2/\text{Pb(II)}$ con un componente añadido para el desplazamiento lateral de la señal del complejo.

Aún así, y como en el caso del sistema $\text{Cys-Gly}/\text{Pb(II)}$, el perfil de concentración del componente 6 no resuelve si el desplazamiento de la señal del complejo se debe a una nueva etapa dentro del proceso de complejación o a algún fenómeno electroquímico. Ejemplos de la primera opción podrían ser una unión Pb-carboxilato (ya vista como complejo electroquímicamente lábil [12]) o un simple cambio del ambiente químico que suponga el fortalecimiento del enlace S-Pb-S ; en la segunda posibilidad están la pérdida de reversibilidad del complejo o su adsorción electroquímica.

Se pensó entonces que, a diferencia de los artefactos electroquímicos, un proceso químico que explique el desplazamiento de potencial de la señal de un complejo podría causar también un cambio en su conformación espacial susceptible de ser percibido mediante la técnica de dicroísmo circular (CD). El análisis MCR-ALS de valoraciones seguidas por CD ya se había utilizado para reforzar los resultados de las valoraciones polarográficas [13], pero esta vez nos propusimos hacer un análisis conjunto de los datos originados por ambos tipos de valoraciones, pues la información que proporcionan podría complementarse en tanto que cada técnica mide propiedades muy diferentes de las moléculas. En cuanto al solapamiento de señales, esta metodología

podría mejorar también la resolución entre la señal polarográfica del ligando libre y la del enlace S-Pb-S, así como entre el Pb(II) libre y el enlace S-Pb, toda vez que las especies activas en dicroísmo circular son el ligando libre y los complejos.

El artículo 11.2 recoge la primera aproximación a esta metodología. Para evaluar su utilidad se escoge el sistema Cys-Gly/Cd(II), un sistema ya estudiado [6] que no presenta solapamiento entre señales, pero sí un desplazamiento de la señal del complejo prácticamente idéntico a los vistos en el artículo 11.1, centrándonos así en este problema en particular.

Al ser un ligando pequeño, un dipéptido, la concentración inicial necesaria para que se diferencie su espectro del de la primera adición de la valoración es cinco veces mayor que la habitual en las medidas DPP, una concentración imposible de adoptar en esta técnica pues produciría problemas de adsorción o incluso la saturación del electrodo. Este hecho resulta muy importante pues, como se puede ver en la figura 1 del artículo 11.2, la combinación de submatrices DPP y CD forma una matriz aumentada en las filas cuyo análisis MCR-ALS genera una matriz **C** única, esto es, una evolución de los procesos de complejación igual en ambas valoraciones. Para asegurarse esta igualdad, se han de adoptar valores de concentración inicial y de ratios $[M]/[L]$ iguales, por lo que nosotros nos vemos obligados a diseñar un experimento a diferentes concentraciones iniciales pero con fracciones comparables de todas las especies químicas implicadas en ambas valoraciones, condición que se cumple en nuestro caso por ser fuertes los complejos formados.

En la figura 2 podemos observar la matriz aumentada que contiene las medidas realizadas tanto en la valoración seguida por DPP (parte izquierda) como la seguida por CD (parte derecha); además, en una ampliación se muestra el prolongado desplazamiento lateral que sufre la señal polarográfica del complejo. Para formar esta matriz aumentada se escaló previamente los valores de ambos tipos de magnitudes pues, de otra forma, la influencia relativa de los datos polarográficos frente a los espectroscópicos hubiera sido muy reducida en el proceso de factorización mediante ALS. Esto se consiguió dividiendo ambas submatrices por el valor absoluto máximo de sus respectivas medidas, un método algo sencillo pero que nos proporcionó buenos resultados tanto en este artículo como en el 11.5.

Para evaluar como el análisis combinado de medidas electroquímicas y espectroscópicas mejora los resultados particulares, analizamos primero por separado cada una de las submatrices.

Análisis de la submatriz DPP

El análisis visual de la submatriz DPP (fig. 2, parte izquierda) indica la existencia de tres señales pero, como sugiere SVD (fig. III), se necesita un cuarto componente que explique el desplazamiento de la señal del complejo para obtener resultados con sentido químico. Los perfiles de concentración (fig. 3b) indican la formación de un complejo $\text{Cd}(\text{CG})_2$ al estabilizarse el componente 3 a ratio $[\text{Cd}^{2+}]/[\text{CG}]$ 0,5, valor al que también desaparece el ligando libre (1). Este complejo presenta un voltamperograma unitario (fig. 3a) con un valor de potencial acorde con la formación de un enlace S-Cd-S.

Sin embargo, el ion Cd^{2+} libre (2) no surge hasta una ratio de aproximadamente 0,8, lo que significa que una fracción del cadmio añadido se sigue complejando sin destruirse el complejo $\text{Cd}(\text{CG})_2$. Este nuevo complejo (tal vez un M_2L_2) debería ser el componente 4, pero su perfil de concentración indica que aparece después del Cd^{2+} libre. Así, una vez más, cuando se analizan sólo datos polarográficos, no es posible concretar si el desplazamiento de la señal del complejo se debe a la formación de un nuevo complejo, al fortalecimiento del enlace S-Cd-S o, simplemente, a un fenómeno electroquímico ajeno al proceso de complejación.

Por último, quisiéramos hacer notar la buena resolución de la matriz **C** comparada con cualquiera de las presentadas en el artículo 11.1, donde el fuerte solapamiento de señales hace necesario el continuo uso de proyecciones de los perfiles de concentración para no falsear las posibles estequiometrias de los complejos formados.

Análisis de la submatriz CD

En el análisis de la submatriz CD (fig. 2, parte derecha) la indicación del número de componentes se hace más necesaria que en DPP, pues el análisis visual es mucho menos intuitivo al no existir una forma de espectro fija. Por suerte, las técnicas espectroscópicas aseguran una linealidad de sus datos más robusta -generalmente, cada componente es

una especie química real- y el método SVD ya no es una mera indicación sino casi una confirmación, al menos en sistemas sencillos como el aquí estudiado.

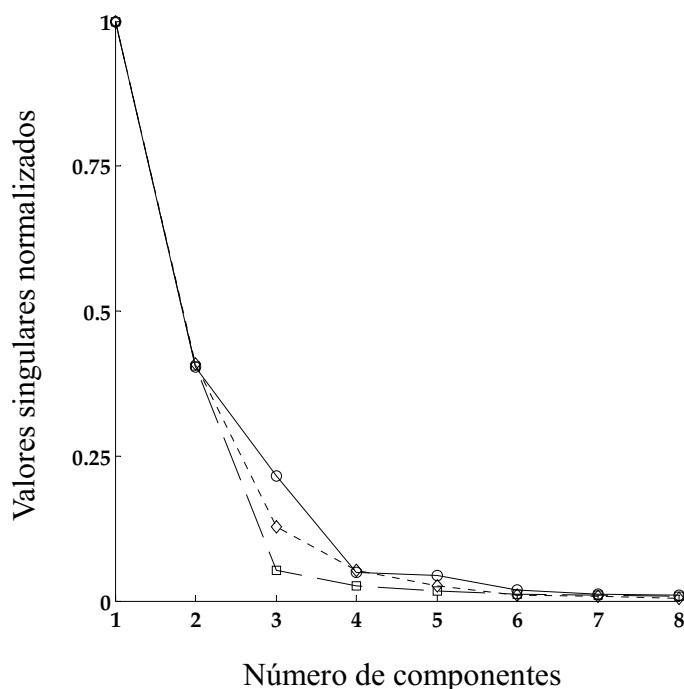


Figura III. Número de componentes estimados por SVD para las submatriz DPP (◇), submatriz CD (□) y la matriz aumentada DPP-CD (○).

El análisis de las matrices V^T y C para tres componentes (figuras 3c y 3d) indica también la existencia del complejo $Cd(CG)_2$ (componente 3) que desaparece para formarse un segundo complejo entre ratios 0,5 y 1 (4). El perfil de la Cys-Gly libre (1) no ofrece ningún significado químico lógico, pues resulta difícil de caracterizar en el análisis quimiométrico al diferenciarse claramente de la línea base sólo en el UV lejano, longitudes de onda que no se pueden alcanzar debido a la saturación por absorbancia que produce la solución amortiguadora. De hecho, este problema nos lo hemos encontrado con todos los ligandos estudiados, desde los fragmentos del glutatión hasta la PC_4 .

Volviendo al análisis de la submatriz CD y si sólo tuviéramos estos resultados, la secuencia de complejación que se propondría como más lógica sería la formación del complejo $Cd(CG)_2$ cuando existe un gran exceso de ligando, pero que se acaba fragmentando al añadir más solución de $Cd(II)$ para formarse dos complejos $Cd(CG)$, uno proveniente del primer complejo y otro que lo haría *de novo* entre ratios 0,5 y 1.

Esta secuencia de complejación no es la publicada en el artículo 11.2, pues allí se optó por tener en cuenta los resultados ya conocidos de la submatriz DPP. Sin embargo, creemos que la interpretación estricta de los resultados de la submatriz CD (donde no se sabe a qué valor de ratio aparece el metal como ion libre) y su comparación con los posteriores de la matriz aumentada, revela con más fuerza la necesidad de utilizar técnicas voltamperométricas en los estudios de complejación, esto es, técnicas en las que se determinen posibles enlaces del metal y su evolución.

Análisis de la matriz aumentada DPP-CD

La respuesta distinta de cada especie en cada técnica y la propia naturaleza de las señales voltamperométricas y espectroscópicas ha de tener su reflejo en las restricciones empleadas durante el proceso ALS, de forma que éstas se pueden aplicar independientemente a cada submatriz; así, por poner un ejemplo, la restricción de no negatividad para señales sólo se aplica a las medidas DPP pues los espectros de dicroísmo pueden tener valores negativos. Del mismo modo, la estimación inicial puede estar diferenciada por submatrices, de forma que se probó una matriz aumentada creada con los algoritmos *peakmaker* (para la submatriz DPP) y SIMPLISMA (para la submatriz CD) que dio buenos resultados, pero finalmente preferimos utilizar la matriz C del análisis polarográfico (fig. 3b) como estimación inicial.

El análisis de las matrices V^T y C (figuras 4a y 4b) permite deducir el siguiente modelo de complejación: al principio de las valoraciones, cuando el exceso de Cys-Gly (1) es grande, cada ion Cd^{2+} añadido se une a dos grupos tiol para formar un complejo $Cd(CG)_2$ (3). Este complejo es inerte desde el punto de vista electroquímico, por lo que todas las especies presentes en el equilibrio de formación presentan su señal polarográfica a un potencial fijo. Conforme nos acercamos a ratio $[Cd^{2+}]/[CG]$ 0,5 y los grupos tiol libres disminuyen, se origina la formación simultánea de un complejo M_2L_2 (4) que no es completa -a diferencia del complejo ML_2 - pues el Cd^{2+} libre (3) aparece a ratio aproximadamente 0,8, justo cuando se estabiliza el complejo M_2L_2 . Dado que finalmente todos los grupos tiol están complejados, se propone que en el complejo $Cd_2(CG)_2$ el segundo cadmio se enlace a grupos carboxilato pues las aminas están protonadas a este pH (fig. 5). Este complejo sería lábil desde el punto de vista electroquímico, ya que su señal polarográfica se desplaza a potenciales más negativos

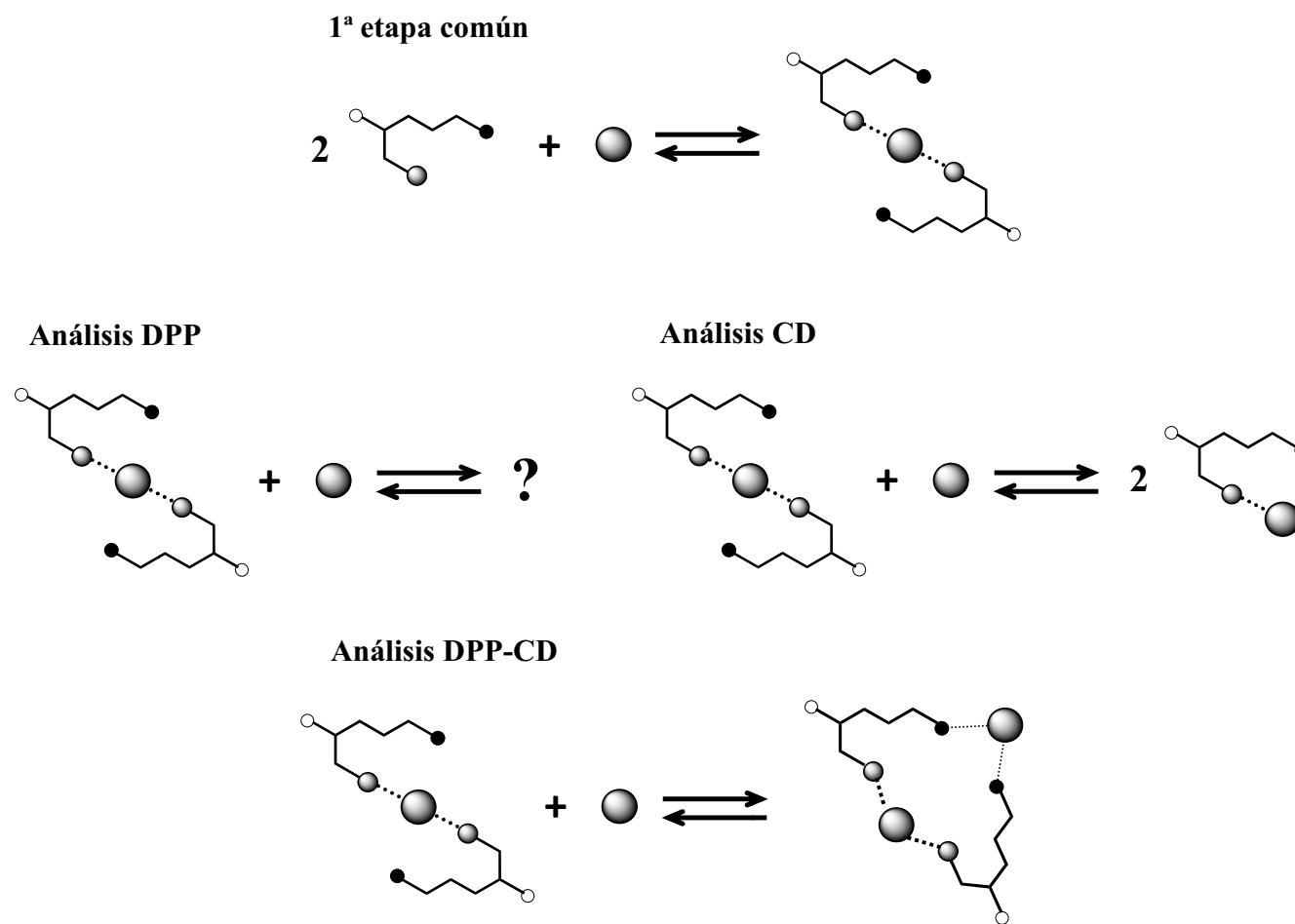
conforme la concentración de cadmio libre aumenta, desplazando el equilibrio hacia la formación del complejo.

Esta unión con grupos carboxilato ya se observó en el estudio del sistema Cys-Gly/Zn(II) [14], en el cual existe un desplazamiento tanto de la señal del complejo $Zn(CG)_2$ como de la señal del Zn(II), pudiendo discernirse entre el ion Zn^{2+} libre y el débilmente complejoado perteneciente a enlaces $Zn-COO^-$. Esta diferenciación no se observa para la señal del Cd(II) libre, probablemente porque según la teoría de Pearson o teoría HSAB el carboxilato es una base dura y muestra más afinidad por el ion Zn^{2+} que está considerado un ácido fronterizo entre duro y blando, mientras que el ion Cd^{2+} es un ácido claramente blando.

La secuencia de complejación propuesta en el artículo 11.2 no es la misma que se publicó anteriormente [6] en un buen trabajo que sólo analizaba datos polarográficos, pero se confirmó más tarde mediante espectrometría de masas [15] (no observándose el complejo Cd:CG 1:1). Esto refuerza la idea de que el análisis combinado MCR-ALS de datos espectroscópicos (CD) y voltamperométricos (DPP) en una herramienta útil a la hora de determinar modelos de complejación más correctos.

Algunas consideraciones finales

Del análisis de la submatriz DPP se deriva una secuencia de complejación incompleta (fig. IV), pues el perfil de concentración del componente 4 indica que el movimiento lateral de la señal del complejo $Cd(CG)_2$ se da cuando el cadmio añadido queda como ion libre. Teniendo en cuenta que todos los componentes tienen el mismo tipo de señal en forma de pico (típica de las técnicas voltamperométricas de impulsos diferencial), la evolución del complejo ML_2 es tan sólo un pequeño avance continuado en el eje de abscisas (unos 40 mV en 30 adiciones) de una señal que no cambia de forma, perdiéndose así una fuente de variabilidad esencial. Probablemente, ésta indistinción sea la causa de que al proceso iterativo ALS le cueste determinar en qué valor de potencial o de ratio $[M]/[L]$ está la divisoria entre los complejos ML_2 y M_2L_2 . Y, como ya vimos al principio de este punto para el sistema $PC_2/Pb(II)$, un cambio de posición de 5-10 mV en el voltamperograma unitario de un componente puede suponer un cambio substancial en su perfil de concentración.






 : ión Cd^{2+} ;
  : grupo S⁻;
  : grupo COO⁻;
  : grupo NH₃⁺

Figura IV. Equilibrios de complejación y estructuras tentativas resultantes del análisis MCR-ALS de cada submatriz por separado y de la matriz aumentada

Analizando los datos de la submatriz CD se llega a una secuencia de complejación que se considera como la más probable (fig. IV), aunque es una conclusión algo más eventual pues se miden los cambios de conformación espacial del ligando -complejado o no-, pero nada se sabe del metal libre ni de los enlaces que con los diferentes grupos funcionales haya podido formar. Por otra parte, como sabemos cómo es el espectro de la Cys-Gly libre, podemos afirmar que existe una ambigüedad entre su espectro unitario y el del complejo M_2L_2 , probablemente por la falta de una forma más característica de aquél, lo que conduce otra vez a perfiles de concentración erróneos.

Llegados al análisis de la matriz aumentada DPP-CD, no estaba claro *a priori* que una información tan diferente como la que recogen ambas técnicas se combinara convenientemente para dar un resultado más inequívoco. Pensemos, por ejemplo, en el complejo $Cd(CG)_2$ o componente 3; según DPP es un enlace S-Cd-S que no se rompe tras formarse, mientras que para CD es una conformación espacial que desaparece casi al momento de ordenarse, hechos que recogen los respectivos perfiles de concentración.

El análisis combinado MCR-ALS de ambos tipos de datos encuentra una solución que depende, como siempre, del grado de variabilidad de cada componente en cada técnica, pero también de las restricciones impuestas en el proceso ALS. Así, en este caso, la restricción de forma aplicada a las señales polarográficas parece tener un peso determinante en el resultado final, excepto para la ambigüedad del desplazamiento que queda dilucidada por el peso en los datos espectroscópicos del componente 4 (su variabilidad es mucho mayor en esa submatriz). Este hecho y otros de menor relevancia explican que la falta de ajuste del análisis conjunto sea algo mayor que cualquiera de los que resultan de los análisis individuales.

12.2.2. Corrección del desplazamiento de potenciales mediante el programa *shiftfit*

En el artículo anterior se ha comprobado que el análisis quimiométrico de medidas DPP-CD puede resultar una herramienta muy útil para solventar las indeterminaciones provocadas por la formación de complejos lábiles. Sin embargo, en el artículo 11.1 observamos también desplazamientos importantes de señales anódicas -tanto asociadas al ligando libre como a los complejos- que hacen decrecer la linealidad de la matriz experimental, alteran líneas base y son especialmente problemáticas cuando están solapadas con otras señales.

El análisis MCR de matrices espectro-voltamperométricas podría ayudar en el caso de señales anódicas móviles del ligando libre, pero existe toda una casuística en los estudios de complejación que demanda un programa que pueda alinear las señales (aun fuertemente solapadas) en una dirección concreta mientras el resto quedan fijas en el mismo potencial y que, una vez resuelto el desplazamiento, ofrezca resultados para resolver los sistemas mediante *hard* o *soft modelling*.

La aplicación del programa *shiftfit* -cuyo fundamento está recogido en el artículo 11.3- a una matriz experimental \mathbf{I}_{exp} comienza con una primera etapa en la que, voltamperograma a voltamperograma, se valoran los desplazamientos de potencial de cada señal a partir de la posición de su máximo en relación a una estimación inicial \mathbf{V}_0 de referencia; entonces, se crea una matriz $\mathbf{V}_{\text{shift},i}$ que contiene los voltamperogramas unitarios puros de \mathbf{V}_0 pero desplazados según una matriz $\Delta\mathbf{E}_{0,i}$, la cual se optimiza en un proceso iterativo mediante los programas *shiftcalc* y *shiftfit*, esto es, mediante algoritmos de mínimos cuadrados no lineales. Como resultado se obtienen las matrices optimizadas $\mathbf{V}_{\text{shift}}$ y $\Delta\mathbf{E}$. Una vez obtenidas estas matrices, se calcula para cada polarograma una matriz $\mathbf{C}_i = \mathbf{I}_{\text{exp},i} [(\mathbf{V}_{\text{shift},i})^T]^+$ como estimación de los perfiles de concentración para los componentes ya desplazados y una matriz reproducida $\mathbf{I}_{\text{rep},i}$ que, una vez agrupada para todos los polarogramas, puede compararse con la matriz experimental para calcular la falta de ajuste (*lack of fit*) global.

Aparte de la matriz \mathbf{I}_{rep} y de la matriz \mathbf{C} , la aplicación de *shiftfit* origina también una matriz corregida $\mathbf{I}_{\text{cor}} (\mathbf{C}\mathbf{V}_0^T)$ donde cada señal está movida y alineada en el potencial de referencia marcado por \mathbf{V}_0 , y una matriz $\Delta\mathbf{E}$ con los valores optimizados de estos desplazamientos. A la matriz corregida se le supone un incremento en la linealidad de los datos con respecto a la matriz experimental y puede ser analizada por MCR-ALS. La otra matriz obtenida, $\Delta\mathbf{E}$, puede servir para ajustar los valores que contiene a una ecuación que interprete un modelo de complejación preestablecido.

Formación de dos complejos lábiles simples sucesivos

En la parte superior de la figura 4 se puede ver la matriz 3D de datos simulados para un sistema de dos complejos lábiles sucesivos con constantes de estabilidad $\log \beta_1 = 4,50$ y $\log \beta_2 = 8,00$. En este caso concreto, el procedimiento normal para determinar las constantes de estabilidad sería calcular, para cada adición, el desplazamiento de

potencial de la señal del metal complejo respecto al metal libre e intentar ajustar estos valores según el método DeFord y Hume. También existe una aproximación *soft modelling* al problema aplicando la restricción de equilibrio químico en el análisis MCR-ALS de la matriz experimental, como ya hicimos para la valoración directa del sistema Cys-Gly/Pb(II) en el artículo 11.1.

La aplicación de MCR-ALS a la matriz (fig. 4, parte derecha) necesita cuatro componentes -metal libre (1), ambos complejos (2 y 3) y ligando libre (4)-, dando un error importante para la factorización de la matriz y una estimación de las constantes de estabilidad algo alejadas de las teóricas. Esto se debe al decrecimiento de la linealidad que supone el gran desplazamiento lateral de las señales del metal y los complejos lábiles.

Si se aplica el programa *shiftfit* a la matriz original (misma figura, parte izquierda) con la idea de optimizar el desplazamiento de las señales y ajustarlo a la ecuación de DeFord y Hume, se proponen sólo dos componentes: uno que englobe el metal libre y complejo y otro para el ligando libre. De esta forma, se obtienen una matriz corregida -que se muestra abajo a la izquierda- donde las tres señales han sido alineadas al potencial escogido en la estimación inicial (sobreimpresa en la matriz original 2D), la matriz \mathbf{C} que no posee relevancia en este caso, y la matriz $\Delta\mathbf{E}$ cuyos valores se muestran para cada voltamperograma con el título “*fitted values of $\Delta\mathbf{E}$* ”. Estos valores, utilizados como en una estrategia *hard modelling*, determinan unas constantes de estabilidad muy ajustadas a los valores teóricos.

Por otra parte, en la Tabla 1 del artículo se muestran los valores de $\log \beta$ y del error asociado a la aplicación de *shiftfit* o MCR-ALS según diferentes niveles de ruido gaussiano añadido a la matriz simulada. En dicha tabla observamos que, cuanto mayor es el % de ruido, la falta de ajuste crece mucho más para el proceso de alineación de señales que para el análisis multivariante de la matriz corregida. Esto es debido a que el ruido que contiene la matriz original afecta poco a la matriz \mathbf{I}_{cor} , pues la estimación inicial \mathbf{V}_0 contiene picos perfectamente gaussianos generados con el programa *peakmaker*; sin embargo, la matriz \mathbf{I}_{rep} se crea teniendo en cuenta también los valores optimizados de $\Delta\mathbf{E}$, mucho más afectados por los cambios de intensidad que supone añadir un nivel alto de ruido a la matriz original. Esta aleatoriedad en el eje de ordenadas de los picos simulados cuanto mayor es el ruido añadido, acaba afectando

también a la determinación de los valores de $\log \beta$, en tanto que provienen de los mismos valores optimizados de la matriz ΔE .

Sistema Glutación / Cd(II)

La matriz experimental de la valoración de GSH con Cd^{2+} muestra cuatro señales, siendo su característica más destacada el acusado desplazamiento de la señal anódica situada a potenciales menos negativos (ventana dentro de la fig. 5a).

Aplicando directamente un análisis MCR-ALS de cuatro componentes se determina la formación del complejo $Cd(GSH)_2$ (figuras 5e y 5f), pero con una falta de ajuste del 14,5% -muy elevada para un sistema sencillo- y la necesidad de restricciones de selectividad tanto para el ligando libre en la ventana de concentraciones como para la anódica del complejo en la ventana voltamperométrica. La mayoría del error proviene de la zona de la señal anódica del complejo -concretamente, la falta de ajuste para esta señal es del 32,0%-, debido a que su movimiento lateral no puede ser explicado con un solo componente.

La aplicación previa de *shifit* a la matriz experimental origina una matriz corregida (fig. 5b) donde cada señal queda fija en el valor de potencial asignado. El análisis MCR-ALS posterior de dicha matriz produce unos resultados (figuras 5c y 5d) casi idénticos a los del anterior análisis, pero con unos errores en cada etapa del 8,2% y 3,1 %, respectivamente, y un error global del 9,3%. Por tanto, la aplicación de *shifit* no modifica en esta ocasión la secuencia de complejación encontrada, pero sí posibilita que el error del análisis quimiométrico sea menor.

El error global resulta de comparar la matriz experimental con una reproducida generada por el producto CV^T proveniente del análisis MCR-ALS y por la matriz ΔE proveniente de la aplicación de *shifit* (fig. 6). Por tanto, este error global siempre será menor que la suma de las faltas de ajuste de aplicar sucesivamente ambos procesos, pues los voltamperogramas puros contenidos en la matriz V^T incluyen un mayor número de parámetros optimizados (siempre que se aplique la restricción de forma) que los contenidos en la matriz V_0 . En algunos sistemas concretos que contienen señales con formas muy alejadas del modelo gaussiano pero optimizables según las ecuaciones

paramétricas utilizadas en la restricción de forma, el error global es incluso menor que el de aplicar solamente *shiftfit*.

Sistema Glicina / Zn(II)

El sistema Gly/Zn(II) presenta un primer complejo parcialmente inerte y un segundo inerte pues, como se puede ver en la figura 7a, la señal del metal desciende pero se desplaza hacia potenciales más negativos conforme se añade el ligando, toda vez que crecen la señal del complejo ML que también se desplaza y la señal del complejo ML₂ que queda en el mismo potencial. Este comportamiento electroquímico no permite la aplicación directa de métodos *hard modelling* y, dado que la condición de linealidad entre intensidad y concentración no se cumple totalmente, tampoco los métodos de análisis multivariante se pueden aplicar. Aún así, como las constantes de estabilidad de estos complejos no son altas [16], el desplazamiento de señales provoca una falta de linealidad razonablemente pequeña, de forma que resulta un buen sistema para comparar las metodologías *shiftfit* y MCR-ALS.

En el primer caso, el valor optimizado del desplazamiento de potencial (ΔE) y la disminución calculada de la intensidad entre las señales M y ML (fig. 7e) se integran en un función Leden de orden cero que, ajustada según DeFord y Hume (fig. 7f), permite obtener las constantes de estabilidad β_1 y β_2 recogidas en la Tabla 2. El error asociado a la aplicación de *shiftfit* es moderado (6,7%) como refleja el parecido entre la matriz experimental (fig. 7a) y la matriz reproducida (fig. 7d).

En el caso de aplicar MCR-ALS, el error es mayor del doble (15,7%) y los resultados no son muy razonables, pues el voltamperograma unitario del complejo ML₂ aparece a potenciales mucho más positivos que el real (figuras 7g y 7h); si no se aplica la restricción de forma a esta señal, su voltamperograma casi se desdobra en dos partes (su fracción disociada y complejada) bajando la falta de ajuste a 10,5% pero con unos perfiles de concentración muy parecidos (figuras 7i y 7j), de forma que las constantes de estabilidad determinadas son prácticamente iguales.

Comparando las constantes calculadas por ambos métodos (tabla 2), parece que las primeras (ajuste de los datos optimizados por *shiftfit*) se acercan más a las publicadas,

sobre todo si las comparamos con aquéllas cuya fuerza iónica es más parecida, las señaladas como *IUPAC tentative values* de $I = 0,05 \text{ mol L}^{-1}$.

Algunas consideraciones finales

Una cuestión básica de la aplicación del programa *shiftfit* es a qué señales se les puede corregir el movimiento lateral y con qué finalidad, pues cuando dicha corrección conlleva la no asunción de un componente probablemente también estemos eliminando una especie química. Así, por ejemplo, si aplicáramos *shiftfit* al desplazamiento provocado por un complejo lábil (submatriz DPP del artículo 11.2) perderíamos toda la información de esa especie y falsearíamos la de otra.

Sin embargo, esta estrategia puede resultar válida para una aproximación *hard modelling* (como en el caso del sistema simulado de este artículo) o incluso para la determinación de un modelo de complejación cuando se corrige el desplazamiento de señales cuyo potencial exacto no da información útil; en este caso, si eliminamos una especie química (pensemos en dos tiolatos de mercurio diferentes que agrupamos bajo una señal anódica única), tampoco afectaría a la secuencia de complejación encontrada, pues los perfiles de concentración están relacionados principalmente con los valores en el eje de ordenadas de las matrices, es decir, con la intensidad medida.

Otro punto importante es la corrección forzosa del desplazamiento de todas las señales de la matriz experimental, incluidas aquéllas que por distintas razones no se quisiera alinear. Si bien es cierto que en la matriz corregida cada componente permanece invariable en el valor de potencial asignado por $V_{0,k}$, para aquellos componentes que no se desea mover no se considera su desplazamiento (es decir, $\Delta E_k = 0$) ni se reproduce, aumentando así la falta de ajuste. Un ejemplo lo encontramos en el sistema GSH/Cd(II) (fig. 5) donde existe un gran desplazamiento de la señal anódica asociada al complejo (componente 1), pero también un desplazamiento muy pequeño para el propio complejo (4) que parece insuficiente para tratarse de otra especie química y, desde luego, para impedir la aplicación de MCR-ALS. Ambas señales son alineadas en I_{cor} , pero sólo el movimiento de la señal anódica se reproduce (fig. 6) con lo que el error es algo mayor que si se considerara corregir el desplazamiento de las dos señales.

Por último, nos gustaría incidir en el hecho de que aunque el análisis MCR-ALS no se realice sobre la matriz experimental sino sobre la matriz corregida, difícilmente puede tener incidencia en la determinación de una secuencia de complejación, pues las formas de las señales experimentales que aportan la información más importante (ligando libre, metal libre y complejos) suelen ser bastante asimilables a la ecuación gaussiana; además, se ha introducido una pequeña variación en el programa *peakmaker* para que puedan generarse picos asimétricos de manera que queden mejor definidas en la estimación inicial V_0 .

12.2.3. Electrodo de película de bismuto

Como ya se ha visto en los artículos comentados, las señales anódicas relacionadas con la oxidación del mercurio suelen suponer una dificultad para el análisis quimiométrico debido al solapamiento con otras señales o por su comportamiento electroquímico errático. Aparte, algunos sistemas concretos -como el γ -Glu-Cys/Pb(II) o el GSH/Pb(II)- presentan un solapamiento tan fuerte entre todas las señales que no parece factible llegar a un modelo de complejación, aun utilizando las metodologías expuestas en los dos puntos anteriores.

Entonces, se decidió utilizar un electrodo de película de bismuto (BiFE) ante la posibilidad de que no se originasen señales anódicas, o bien lo hicieran a un potencial donde el solapamiento con el resto de señales fuera menor. En varios artículos donde se describe la interacción de algunos metales con BiFE se observa un claro desdoblamiento de la señal del Zn(II) [17, 18] o bien se intuye para el Cd(II) [19] conforme aumentan sus concentraciones, y decimos que sólo se intuye porque generalmente los rangos estudiados son demasiado pequeños. Por tanto, ante las implicaciones que este comportamiento puede tener en la complejación de fitoquelatinas, se decidió conocer con más detalle a qué metales afecta dicho desdoblamiento y sus intervalos de linealidad para nuestro substrato, modo y parámetros de deposición; parámetros, por cierto, cuya optimización hasta conseguir una película de bismuto estable con buena repetitividad y reproducibilidad no se presentan propiamente como resultados, pero suponen una de las implicaciones más importantes del artículo 11.4 que ahora comentaremos.

Estudio del plomo

Las series de voltamperogramas (DPASV) y cronopotenciogramas (CCSCP) muestran un único pico que no se desdobra (fig. 1). El rango de linealidad del área total de cada medida con la concentración añadida de plomo se sitúa entre los valores 1×10^{-7} y 9×10^{-6} mol L⁻¹.

Estudio del cadmio

En la figura 2a observamos como a bajas concentraciones existe un único pico en la serie de voltamperogramas, pero conforme crece la concentración de Cd(II) aparece una nueva señal a potenciales más negativos mientras la primera parece mantenerse. El intervalo de linealidad se establece entre 1×10^{-7} y 4×10^{-6} mol L⁻¹, pues a valores más grandes tiene lugar la saturación de la película de bismuto. La aplicación de MCR-ALS (figuras 2b y 2c) permite comprobar que la segunda señal no aparece hasta que la primera queda constante, así como que la suma de los perfiles de concentración de ambos componentes (señales) también es lineal con la concentración de cadmio añadida.

La realización de una nueva valoración dejando constante el potencial de deposición pero variando el tiempo en que se aplica dicho potencial (fig. 2d) muestra el mismo comportamiento, es decir, a tiempos de deposición muy pequeños sólo existe una señal y posteriormente crece otra a potenciales más negativos, mientras la primera tiende a quedar constante.

La evolución de la valoración registrada por cronopotenciometría (fig. 3a) muestra el mismo patrón que la registrada por ASV, una señal única a concentraciones pequeñas y la aparición de un nuevo pico a potenciales más negativos; también la aplicación de MCR-ALS da resultados semejantes a los vistos para ASV. Por otra parte, la influencia del potencial de deposición y de la intensidad de oxidación en la forma de los cronopotenciogramas resulta diferente, pues se observa que conforme es mayor el potencial de deposición (fig. 3d) tan sólo crece la señal situada a potenciales más negativos, mientras que la intensidad de la etapa de redisolución afecta por igual a ambas señales (fig. 3e).

Los resultados de todos los experimentos realizados con cadmio no parecen indicar la existencia de un desdoblamiento de señales en el sentido estricto de la palabra (una señal que se convierte en dos diferentes), sino la aparición de una nueva señal que se solapa con otra ya existente. La presencia de dos señales diferentes parece estar relacionada con la etapa de preconcentración del Cd(II) en bismuto, como también lo sugiere el hecho de que el tiempo de medida cuando se reoxida el metal amalgamado afecte por igual a ambos picos.

Estudio del zinc

Las valoraciones realizadas con zinc son las mismas que con cadmio, pero los resultados ofrecidos implican algunas diferencias entre los dos metales cuando se preconcentran en la película de bismuto.

En el caso de la voltamperometría de redisolución a diferentes concentraciones de zinc (fig. 4a), se observa primero una única señal muy ancha que se desdobra en dos sin que ninguna se mantenga del todo constante, hecho que recoge el análisis MCR-ALS. La valoración a diferentes tiempos de deposición (fig. 4d) presenta un resultado semejante aunque, como en el caso del Cd(II), la diferenciación entre las dos señales es mayor.

En la valoración seguida por CCSCP, los primeros cronopotenciogramas experimentales no presentan apenas diferenciación entre pico y línea base, como luego se observa en las medidas corregidas (fig. 5a). Aún así, parece que otra vez se observa un auténtico desdoblamiento de la señal al ir añadiendo Zn(II), aunque es francamente difícil de precisar. Sin embargo, el análisis MCR-ALS de ambas señales deja claro que la señal aparecida a potenciales menos negativos sigue creciendo una vez que la otra se ha estabilizado, y que la suma de los perfiles de concentración de ambas señales es constante con la concentración de metal añadida, como también ocurría en las medidas ASV.

Respecto a la dependencia de las señales con los parámetros de la CCSCP, tanto el potencial de deposición como la intensidad de reoxidación tienen una clara influencia en la forma de los cronopotenciogramas (figuras 5d y 5e, respectivamente), a diferencia de lo visto en los experimentos con Cd(II).

Comparativa de los tres metales

El diferente comportamiento de Pb(II), Cd(II) y Zn(II) parece estar estrechamente relacionado con sus solubilidades en bismuto; concretamente, el plomo forma soluciones sólidas en bismuto con una solubilidad del 0,7%, mientras que la solubilidad del zinc es mucho más baja y la del cadmio es cero [20]. Por tanto, el plomo presenta una señal única en DPASV y CCSCP aun a concentraciones altas, pues se preconcentra fácil y homogéneamente en la película de bismuto. Sin embargo, en el caso del cadmio y zinc parece que existieran dos tipos de deposición sobre el electrodo de trabajo.

En principio se pensó en la posibilidad de que ambos metales se depositaran también sobre el soporte de carbono vitrificado, pues nunca queda totalmente cubierto por la película de bismuto. Si éste fuera el caso, el desdoblamiento de la señal del metal se constituiría de una señal reversible correspondiente a la deposición sobre la película de bismuto, y de otra señal irreversible correspondiente a la deposición sobre el soporte de carbono [18, 21], distinción que no percibimos en la figura V, donde ambas señales son claramente reversibles.

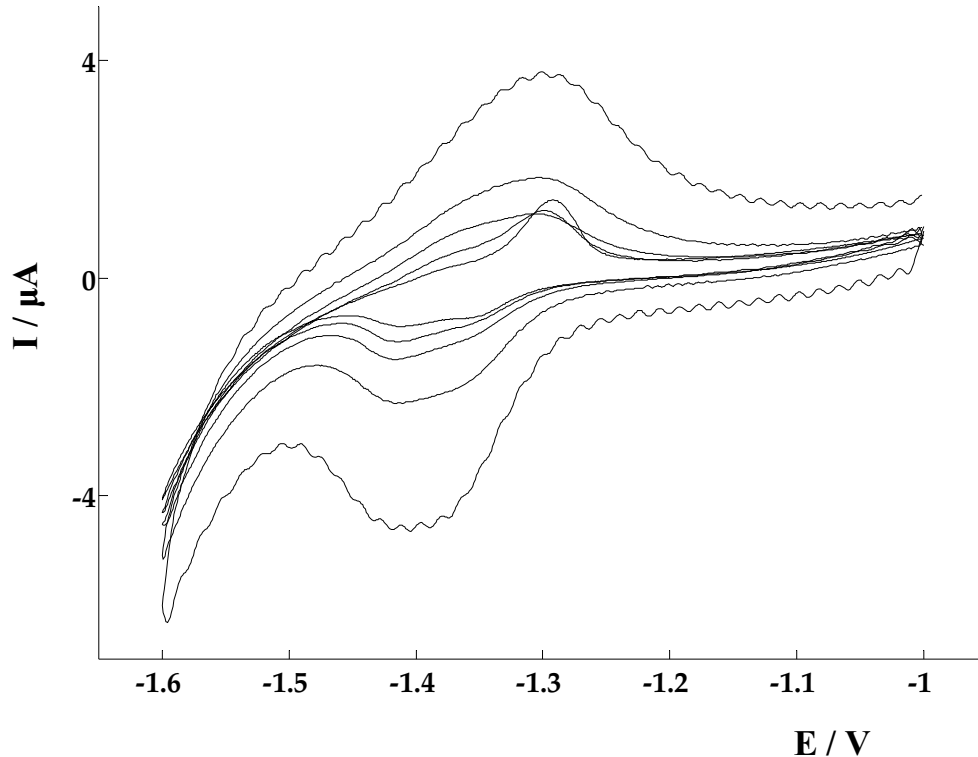


Figura V. Voltamperometría cíclica de una disolución 1×10^{-4} mol L $^{-1}$ de Zn(II) en BiFE, en la cual se aprecia que las dos señales originadas son reversibles. Las velocidades de barrido son 10, 25, 50, 100 y 250 mV s $^{-1}$.

En consecuencia, deben existir dos tipos diferentes de interacción con la película de bismuto tanto para el cadmio como para el zinc. Sin la utilización de técnicas de análisis de superficie es difícil concretar por qué se produce el desdoblamiento de señales, pero lo más probable es que al obtener la película de bismuto se formen dos capas diferentes o dos tipos de cristales (algo indicamos en el capítulo 7.2) de forma que se produzca luego una interacción diferente de los metales durante la etapa de solubilización.

En el caso del Cd(II), los experimentos realizados indican que esta doble interacción está muy diferenciada, pues las dos señales se distinguen perfectamente y la intensidad de reoxidación en CCSCP no tiene un efecto diferencial sobre ellas. Probablemente, el cadmio se deposita primero en la capa más profunda de la película de bismuto y, cuando ésta se completa, en la más exterior. Esta última interacción resultaría más débil, pues en la etapa de medida, cuando se oxida el metal, la segunda señal aparece a potenciales más negativos.

En el caso del zinc -cuya solubilidad es baja pero mayor que la del cadmio- se irían llenando ambas capas indistintamente cuando la concentración es baja y, conforme aumenta ésta, la capa interior tiende a quedar saturada mientras la más exterior sigue acumulando zinc. En este caso, la interacción con la capa más externa es más fuerte que con la capa interna, por lo que la señal surgida en segundo lugar aparece a potenciales menos negativos. De todas formas, existe una clara interrelación entre ellas (probablemente fenómenos de difusión), de forma que se observa un auténtico desdoblamiento de señales conforme el zinc solubilizado aumenta.

La hipótesis de la difusión entre capas se ve reforzada por el hecho de que a altas intensidades de reoxidación (etapa de medida más rápida) se observen las dos señales a diferencia de cuando se utilizan intensidades bajas y existe tiempo para la difusión hacia la capa más interna.

12.3. Nuevas herramientas y metodologías: aplicación a sistemas con Pb(II)

En este apartado se aplican las metodologías expuestas a valoraciones realizadas con Pb(II), siempre más complicadas que para otros metales debido a los mayores

desplazamientos laterales y al mayor solapamiento entre señales, como ya se vio en el artículo 11.1.

12.3.1. Estudio del sistema PC_3 / $Pb(II)$ aplicando *shiftfit* y análisis MCR-ALS de matrices DPP-CD

Las valoraciones directa e inversa del sistema $PC_3/Pb(II)$ presentan algunas señales que sufren desplazamientos de potencial, pero no en todos los casos se puede justificar su corrección mediante el programa *shiftfit*. Así, cuando se duda de si el desplazamiento es debido a la aparición de un nuevo complejo, el análisis conjunto MCR-ALS de datos polarográficos y espectroscópicos se hace necesario.

En el artículo 11.5, donde se recoge este estudio, primero se presentan los resultados de la valoración directa por ser aquella que imita el mecanismo propio de las plantas, es decir, sintetizar fitoquelatinas una vez los metales entran en el citosol, pero ahora invertiremos el orden de presentación porque la valoración inversa siempre ofrece una información más clara y completa.

Valoración de PC_3 con $Pb(II)$ - Análisis de la submatriz DPP

La matriz polarográfica de la valoración inversa (fig. 5, I_{DPP}) presenta cuatro señales: al principio de la valoración se observa la señal del ligando libre (4); conforme esta decrece, aumenta la señal perteneciente a un complejo (2) y su señal anódica asociada (3); cuando la señal del complejo se estabiliza, la señal 3 sigue creciendo y ensañándose hasta que finalmente surge solapada la señal 1 del plomo libre que quedaba oculta. Aunque la inspección visual de la valoración parece indicar sólo cuatro especies químicas, SVD apunta la necesidad de un análisis con más componentes, probablemente por el desplazamiento moderado que sufre la señal anódica 3 hacia potenciales más positivos y el desplazamiento más pequeño que sufre la señal del complejo hacia potenciales más negativos; de hecho, estos desplazamientos provocan problemas irresolubles de selectividad entre ambas señales cuando se realiza un análisis MCR-ALS de cuatro componentes.

La aplicación de *shiftfit* para intentar solucionar estos problemas de selectividad no resulta aconsejable pues, dado que finalmente todos los movimientos de las señales

quedarían rectificadas en I_{cor} , fijar la señal 3 implicaría perder la información que eventualmente conlleve el desplazamiento del complejo, desplazamiento que puede deberse a la formación de un nuevo complejo lábil como ya se vio en el artículo 11.2 para el sistema Cys-Gly/Cd(II).

El análisis MCR-ALS con cinco componentes (las 4 señales más el desplazamiento del complejo que hemos llamado 2') indica la formación de un complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ según los perfiles de concentración del ligando libre, el propio complejo y la proyección del perfil del plomo libre (fig. 5b). En este complejo, el ión plomo estaría enlazado a dos grupos tiol, dada la posición de su voltamperograma unitario con respecto a la del plomo libre (fig. 5a). El perfil de concentración del componente 2' no parece tener una lógica desde el punto de vista químico, pues aparece y desaparece entre ratio $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{PC}_3]$ 0 y 1 para volver a reaparecer sin que se pueda definir entonces una estequiometría. Esto se debe, como ya se explicó en las consideraciones finales del apartado 12.2.2, a la dificultad de MCR-ALS para situar los voltamperogramas unitarios de dos componentes diferentes pertenecientes a una única señal polarográfica que se desplaza de forma tan lenta y progresiva.

Valoración de PC_3 con $\text{Pb}(\text{II})$ - Análisis de la matriz DPP-CD

Se realiza la misma valoración por dicroísmo circular (con la misma concentración inicial y los mismos valores de ratio $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{PC}_3]$) y se realiza un análisis conjunto de la matriz aumentada con los datos de ambas valoraciones (fig. 5, $I_{\text{DPP-CD}}$), aunque sólo escogemos la parte donde están situadas las señales del ligando libre y del complejo para que así el número de medidas o columnas de cada submatriz sean lo más iguales posible; de todas formas, ni el plomo libre ni las señales anódicas asociadas al complejo son especies activas en dicroísmo, y la información que aportan no va a cambiar con respecto a su análisis DPP, como ya se vio anteriormente.

En el resultado de la factorización de la matriz aumentada (figuras 5c y 5d) se observa claramente la formación del complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ y también como los espectros unitarios del complejo (2) y su desplazamiento (2') están bien diferenciados, permitiendo situar más correctamente sus voltamperogramas unitarios. De esta forma, el perfil de concentración del componente 2' sólo aparece ahora a partir de ratio

$[\text{Pb}^{2+}]/[\text{PC}_3]$ 1 aunque sin que se pueda deducir una estequiometría, pues crece entre ratio 1 y aproximadamente 2,5 y después tiende a mantenerse.

Así pues, dado que el componente 2' aparece cuando el plomo añadido queda como ion libre (a diferencia de lo visto en el artículo 11.2) y que tiene su propio espectro de dicroísmo, se puede concluir que tras la formación del complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ tiene lugar un cambio en su conformación espacial que produce un fortalecimiento del enlace S-Pb-S ya existente.

Valoración de Pb(II) con PC_3 - Análisis de la submatriz DPP

En la matriz experimental producto de esta valoración (fig. 1, \mathbf{I}_{DPP}) se observan seis señales diferentes: el plomo libre (1) al principio de la valoración; según se añade PC_3 , se forma un complejo (2) y su señal anódica asociada (3) que se solapa muy fuertemente a la del Pb(II) libre; entonces, cuando la intensidad de la señal del complejo queda constante, comienza a surgir una nueva señal (4) -en principio solapada al complejo y separándose con el progreso de la valoración- que resulta ser la del ligando libre, pues no parecen formarse más complejos; finalmente, a altas concentraciones de PC_3 libre, surgen otras señales anódicas (5 y 6) relativas a su presencia y que cambian de forma distorsionando la línea base, como ya se había observado en el final de las valoraciones directas del artículo 11.1.

SVD apunta la existencia de 6 componentes (fig. 2) y no porque existan seis señales -pues las dependencias entre ellas disminuye el número de componentes necesarios para explicar la variabilidad de los datos-, sino por la pérdida de linealidad que suponen las señales anódicas menores y, más notablemente, por el prolongado desplazamiento que sufre la señal 4 del ligando libre. De hecho, ni siquiera utilizando dos componentes para esta señal, el análisis MCR-ALS llega a buenos resultados, aparte de que no se podría asegurar que la suma de sus perfiles de concentración es lineal con la concentración de PC_3 libre.

Dado que el movimiento de la señal 4 no afecta al comportamiento electroquímico del resto de las señales presentes en la valoración, y que la información útil que ofrece proviene de sus valores de intensidad y no del potencial (una vez se la ha identificado como algún tiolato de mercurio de la PC_3), resulta una buena candidata para corregir el

desplazamiento de potencial que presenta mediante el programa *shiftfit*. Esta operación no resulta fácil en principio pues, por una parte, dicho desplazamiento es considerable (más de 60 mV) y, por otra, la señal surge totalmente solapada con la del complejo ya formado, de manera que forzar su movimiento podría alterar sensiblemente la señal del complejo.

Como se puede ver en la matriz corregida (fig. 1, \mathbf{I}_{cor}), *shiftfit* separa la señal de la PC_3 de la del complejo e incluso corrige su movimiento cuando está casi oculta, sustrayendo al complejo la intensidad que considera perteneciente al ligando libre. En verdad, como refleja la matriz $\Delta\mathbf{E}$, dicha corrección comienza algo antes de lo necesario a juzgar por los resultados finales, aunque de haber elegido un potencial más cercano a la señal del complejo se hubiera conseguido una corrección del movimiento ajustada a la realidad experimental. Como ya dijimos, la aplicación de *shiftfit* puede ser muy sensible a la estimación inicial y, pensando en un eventual análisis conjunto, escogimos como referencia para V_0 el potencial de la PC_3 libre en la valoración inversa. De todas formas, esta corrección prematura no afecta apenas al análisis quimiométrico posterior, pues los valores de intensidad restados a la señal del complejo aún son pequeños.

Obtenida una matriz \mathbf{I}_{cor} más lineal que la experimental (fig. 2), el análisis MCR-ALS parece indicar la formación del mismo complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$, pues su perfil de concentración crece hasta ratio $[\text{PC}_3]/[\text{Pb}^{2+}]$ 1 que es donde la proyección del perfil de la PC_3 libre comienza a aparecer (fig. 3b). La proyección del perfil de concentración del plomo libre termina antes de ratio 1, lo cual contradice la formación de un complejo $\text{Pb}:\text{PC}_3$ 1:1, pero resulta poco fiable pues su señal está muy fuertemente solapada durante toda su evolución a la señal anódica asociada al complejo.

Como ya se ha podido advertir y no sólo en este artículo, en diversas ocasiones tenemos que recurrir a la proyección de los perfiles de concentración de algún componente debido al solapamiento entre señales. La validez o no de dichas proyecciones depende del grado de solapamiento en la ventana voltamperométrica y, sobre todo, en la ventana de concentraciones; es decir, si dos señales presentan potenciales de pico muy cercanos y, aparte, progresan en la misma etapa de la valoración, sus perfiles de concentración suelen llevar a resultados erróneos y contradictorios con otros componentes cuyo solapamiento pueda ser menor.

Valoración de Pb(II) con PC₃ - Análisis de la matriz DPP-CD

Las dos conformaciones que presenta el complejo Pb(PC₃) al final de la valoración inversa -esto es, la diferenciación entre los componentes 2 y 2'- probablemente se deba a un cambio en el ambiente químico provocado por el exceso de plomo libre; por tanto, este cambio debería verse también al inicio de las valoraciones directas DPP y CD.

Efectivamente, como muestra la figura VI, la formación del complejo Pb(PC₃) viene acompañada de un debilitamiento del enlace S-Pb-S y una reducción electroquímicamente más irreversible (señales más anchas). Del mismo modo, en la figura 4 del artículo se observa también una evolución espectral.

El análisis de la matriz aumentada con los datos de las valoraciones registradas por polarografía y dicroísmo no llega a ninguna conclusión válida debido a la poca diferenciación de las señales polarográficas. Tal vez, con un número muy superior de adiciones al principio de ambas valoraciones, MCR-ALS podría distinguir mejor los componentes 2 y 2' pero, de todas formas, la coincidencia entre el final de la valoración inversa y el principio de la directa parece evidente.

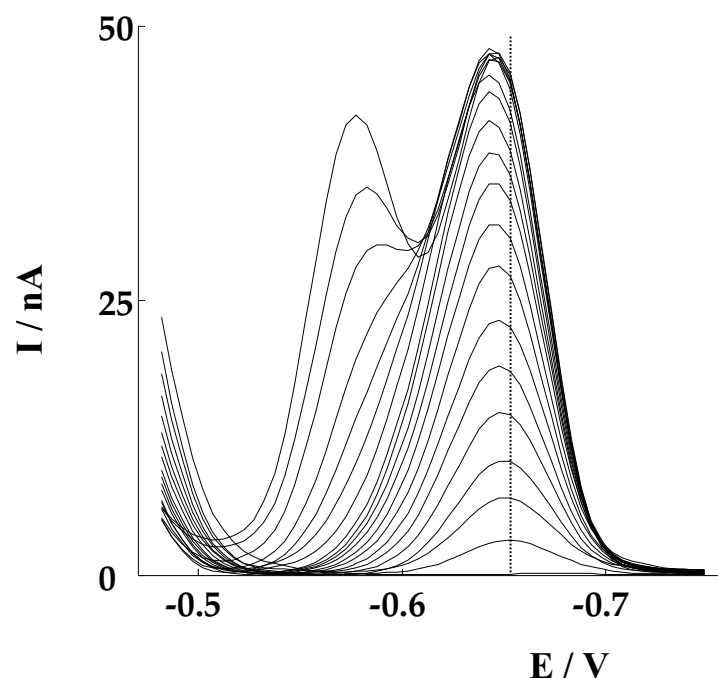


Figura VI. Primeros polarogramas de la matriz experimental de la figura 1, donde se observa el desplazamiento de potencial y el ensanchamiento de la señal del complejo durante su formación.

Conclusión

Tanto el análisis de la valoración directa como de la inversa concluyen la formación de un único complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ que presenta conformaciones diferentes dependiendo de si en la solución existe exceso de $\text{Pb}(\text{II})$ libre. Las razones de este cambio de conformación no están claras, pero probablemente tenga que ver con que este complejo tiene un grupo tiol libre y, aunque no se llegue a complejar, pueda existir alguna interacción débil con los iones $\text{Pb}(\text{II})$ en solución que produzca un cambio en su conformación espacial. Esta hipótesis parece reforzada por el estudio del sistema $\text{PC}_2/\text{Pb}(\text{II})$ -resuelto y no publicado- y el sistema $\text{PC}_4/\text{Pb}(\text{II})$ -no resuelto de forma enteramente satisfactoria-, en cuyas valoraciones espectroscópicas inversas (fig. VII) no se observan variaciones una vez formados un complejo $\text{Pb}(\text{PC}_2)$ y, muy probablemente, un complejo $\text{Pb}_2(\text{PC}_4)$, complejos en los cuales no existe ningún grupo tiol libre.

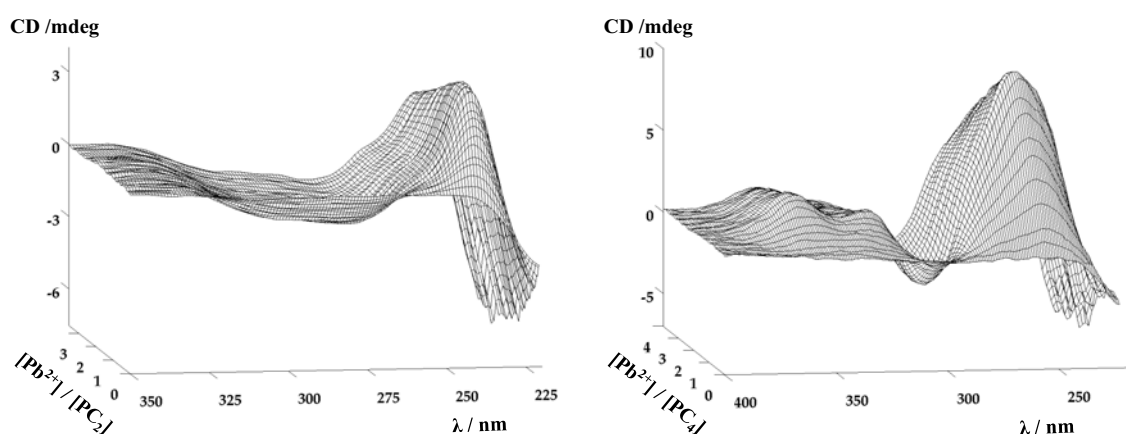


Figura VII. Espectros registrados por dicroísmo circular de una solución $5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PC_2 (izquierda) y $2 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ de PC_4 (derecha) valoradas ambas con $\text{Pb}(\text{II})$ a pH 6,8 en una solución reguladora $5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ de Bis-TRIS.

12.3.2. Sistema $\text{PC}_3/\text{Pb}(\text{II})$: diferencias entre los resultados de los artículos 11.1 y 11.5

Una de las conclusiones del artículo 11.1 es la fortaleza advertida para el enlace Cys-Pb-Cys y, tal vez, la relativa debilidad y escasa tendencia a formarse del enlace entre el ion Pb^{2+} y un solo grupo tiol. Sorprendía especialmente el caso del ligando PC_3 , cuyo modelo de complejación propuesto para la valoración inversa es, recordémoslo, la formación de un complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ seguido de un complejo $\text{Pb}_2(\text{PC}_3)$ sin que aquél desaparezca; sin embargo, en la valoración directa no se forma el complejo $\text{Pb}_2(\text{PC}_3)$ a

pesar de que en todo momento existe un grupo tiol libre al que poder enlazarse. Además, la reciprocidad de especies entre los dos tipos de valoraciones suele ser la pauta normal en los estudios publicados para sistemas PC/Mⁿ⁺, salvo en el caso de alguna especie muy estable -como el ión Cd²⁺ enlazado a cuatro grupos tiol en el complejo Cd(PC₂)₄ [22]-, por lo que aún resulta más extraño este comportamiento.

Por otra parte, en el recién visto artículo 11.5 se estudia el mismo sistema PC₃/Pb(II) con el mismo electrodo, pH y concentraciones iniciales que en el artículo 11.1, pero en esta ocasión no se observa la formación del complejo Pb₂(PC₃) en ninguna de las dos valoraciones. Dado que las condiciones experimentales son prácticamente idénticas para los dos artículos, intentaremos buscar alguna hipótesis que explique estas diferencias.

En la figura VIII se muestran las matrices polarográficas de las cuatro valoraciones del sistema PC₃/Pb(II) recogidas en los susodichos artículos, y cuyas desigualdades morfológicas son evidentes. En cuanto a los parámetros experimentales a las que están realizadas, la única diferencia entre artículos es la solución reguladora utilizada, maléico/maleato en el caso del artículo 11.1 (VIIIa y VIIIb) y Bis-TRIS en el caso del 11.5 (VIIIc y VIIIId); dentro de cada artículo, la única diferencia entre valoraciones inversas (VIIIa y VIIIc) y directas (VIIIb y VIIIId) reside en que la concentración inicial de Pb(II) es la mitad que la concentración inicial de PC₃.

Como no existen otras diferencias experimentales apreciables, parecería que el enlace con un resto de cisteína es excesivamente débil y su formación -esto es, la formación del complejo Pb₂(PC₃)- necesita una concentración inicial suficiente (mayor que 2x10⁻⁵ mol L⁻¹) o bien el concurso de una molécula que de alguna manera ayude a formarlo, como podría ser un diácido carboxílico (caso del ácido maléico pero no del Bis-TRIS).

Para apoyar esta hipótesis, presentamos los siguientes hechos:

- i) El ion Pb²⁺ forma complejos electroquímicamente lábiles con el grupo funcional carboxilato [12]; de hecho, en el trabajo 11.6 se reconocerá también el complejo lábil Pb₂(GSH)₂ donde un ión plomo está unido a grupos carboxilato. En la figura IX se observa el desplazamiento de potencial que sufre el Pb(II) en una solución reguladora de Bis-TRIS y de maléico/maleato respecto al Pb(II) en KNO₃, lo que da idea de la mayor interacción que sufre este ion cuando en el medio existen grupos funcionales diácido carboxílico.

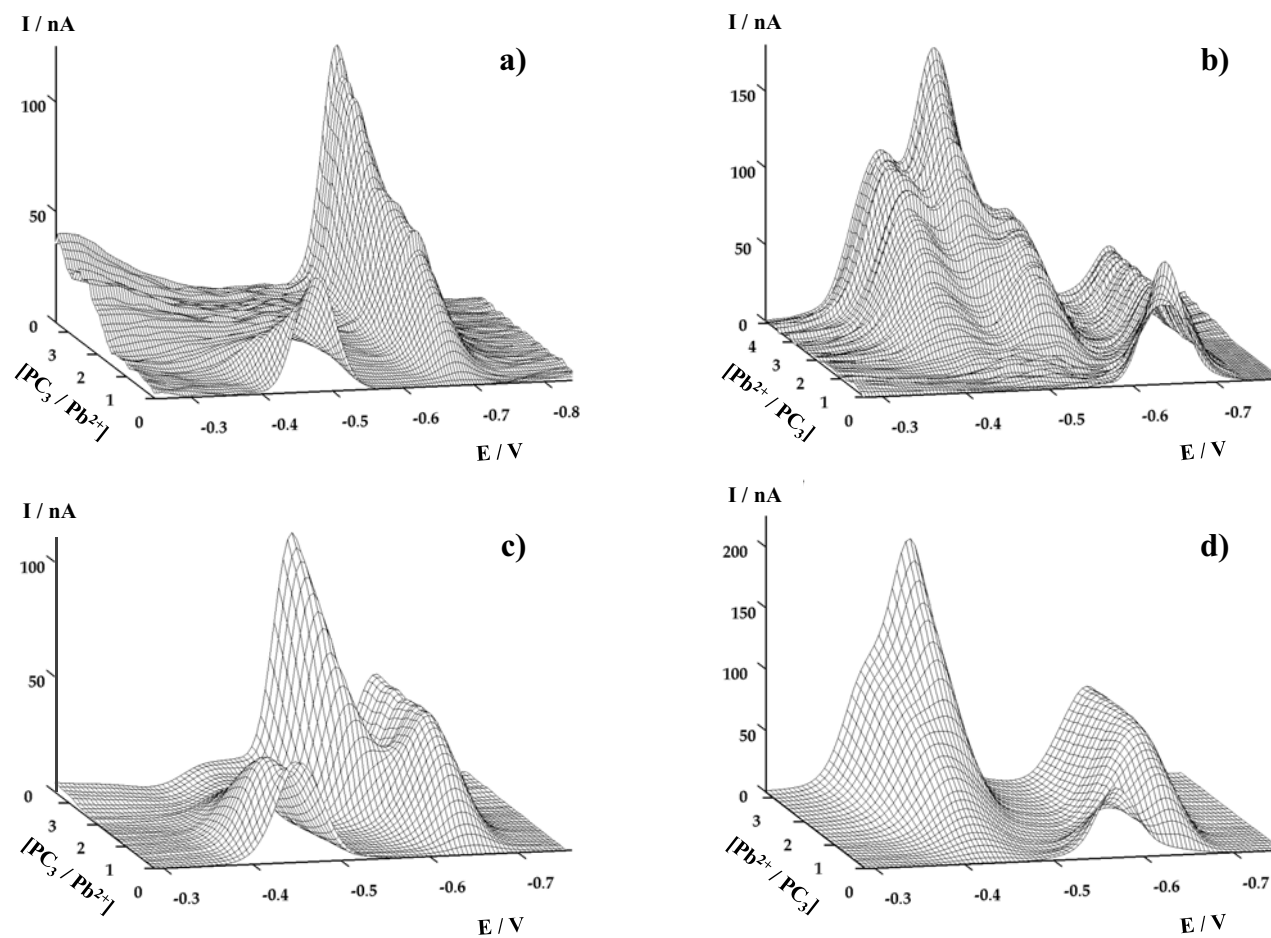


Figura VIII. Valoraciones DPP obtenidas de los artículos 11.1 y 11.5. **(a)** Solución 1×10^{-5} mol L^{-1} de Pb(II) valorada con PC_3 a pH 6,8 en una solución maleico/maleato $0,01$ mol L^{-1} . **(b)** Solución 2×10^{-5} mol L^{-1} de PC_3 valorada con Pb(II) a idénticas condiciones que (a). **(c)** Solución 1×10^{-5} mol L^{-1} de Pb(II) valorada con PC_3 a pH 6,8 en una solución Bis-TRIS $0,05$ mol L^{-1} . **(d)** Solución 2×10^{-5} mol L^{-1} de PC_3 valorada con Pb(II) a idénticas condiciones que (c).

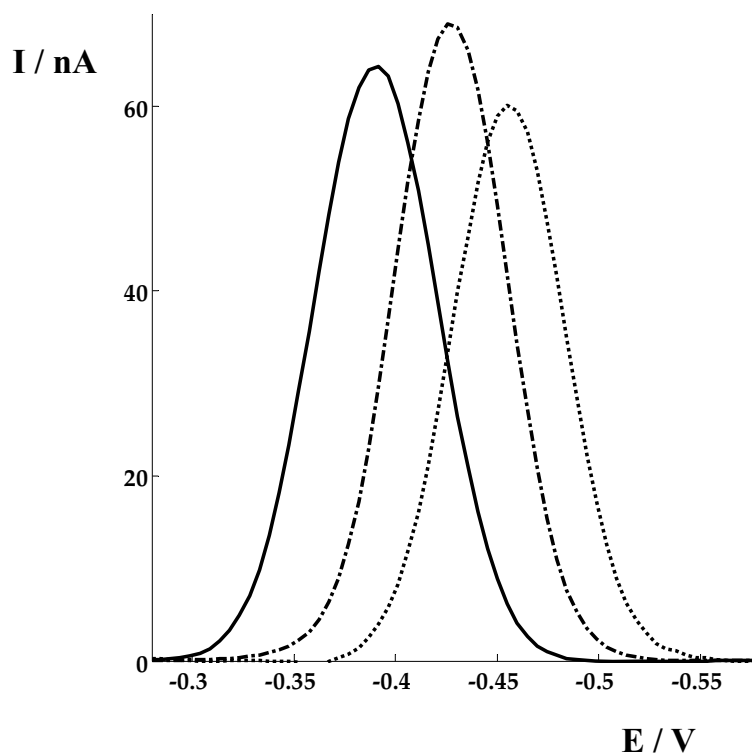


Figura IX. Polarogramas de una solución 1×10^{-5} mol L $^{-1}$ de Pb(II) en: KNO $_3$ 0,05 mol L $^{-1}$, pH \approx 4,5 (—); en Bis-TRIS 0,05 mol L $^{-1}$ / KNO $_3$ 0,05 mol L $^{-1}$, pH 6,8 (-.-.-); en maleico-maleato 0,01 mol L $^{-1}$ / KNO $_3$ 0,05 mol L $^{-1}$, pH 6,8 (----).

- ii) En el estudio de competición del Hg(II) entre los ligandos PC $_3$ y DMPS seguido por la técnica de ITC [23], se observa la formación del complejo Hg $_2$ (PC $_3$). En este complejo, el ion Hg(II) unido a dos grupos tioles no interacciona con el DMPS, mientras que el ion Hg(II) que sólo queda enlazado a un grupo tiol sí lo hace. Teniendo en cuenta que el carácter blando de los iones Hg $^{2+}$ y Pb $^{2+}$ es muy parecido, también el Pb(II) que sólo se compleja a un grupo tiol en el complejo Pb $_2$ (PC $_3$) podría interaccionar con una molécula de ácido maleico, ayudando a la formación del enlace Pb-S, a diferencia de lo visto en los experimentos llevados a cabo en solución amortiguadora de Bis-TRIS.
- iii) Según acabamos de ver en el artículo 11.5 para un medio Bis-TRIS, los iones Pb $^{2+}$ no llegan a enlazarse con el grupo tiol libre del complejo Pb(PC $_3$), pero sí existe una interacción suficientemente fuerte como para cambiar su conformación espacial, fenómeno que no se observa para los complejos Pb(PC $_2$) ni Pb $_2$ (PC $_4$), en los cuales no queda ningún grupo tiol libre.

iv) La valoración de una disolución 4×10^{-5} mol L⁻¹ de PC₃ con Pb(II) en medio Bis-TRIS origina una matriz polarográfica (fig. X) cuya morfología es muy parecida a su homóloga del artículo 11.1 (fig. VIIIb). Aunque no se ha realizado un estudio quimiométrico completo de esta valoración, resulta manifiesta la formación de los complejos Pb(PC₃) y Pb₂(PC₃).

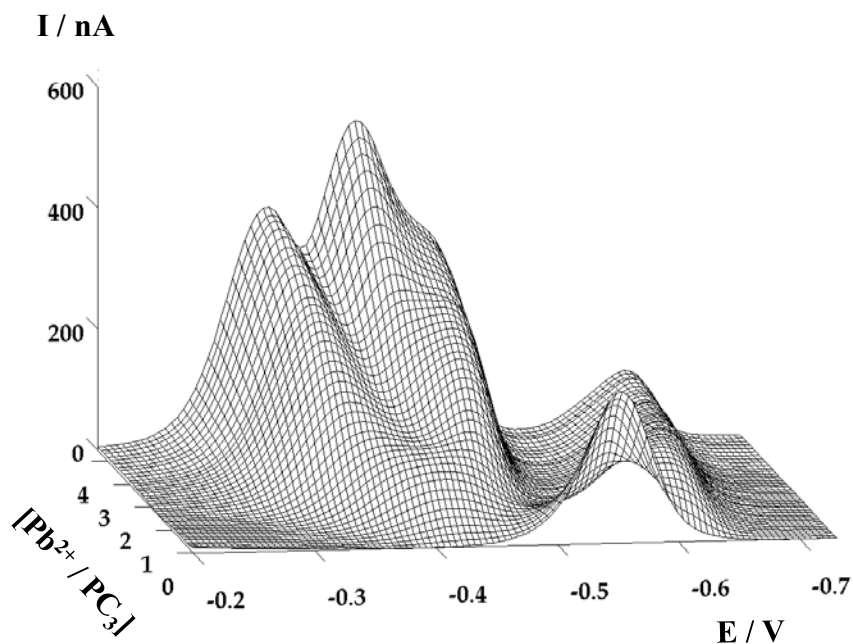


Figura X. Valoración polarográfica de una solución 4×10^{-5} mol L⁻¹ de PC₃ valorada con Pb(II) en una solución Bis-TRIS $0,05$ mol L⁻¹, pH 6,8.

Aunque todos estos hechos no resultan concluyentes, sí parecen orientar en la idea de un enlace Pb-Cys débil que necesita un cierto valor de concentración inicial de ligando o metal para formarse, pero que puede ser menor si en el medio existen moléculas que de por sí ya interaccionan con el Pb(II), como es el caso de un diácido carboxílico. En sistemas análogos con Cd(II) y Zn(II) [24, 25], se concluye que el enlace Cd-S se forma con facilidad mientras el enlace Zn-S no se ha observado, comportamiento coherente con la teoría de Pearson según la cual el grupo tiol es una base blanda y la dureza de los tres cationes aumenta en relación Cd(II) < Pb(II) < Zn(II).

12.3.3. Estudio del sistema GSH / Pb(II) con un electrodo de película de bismuto

Dada nuestra inexperiencia en estudios de sistemas PC/Mⁿ⁺ utilizando un electrodo BiFE, en el artículo 11.6 se examina primero el comportamiento electroquímico de cada especie química que conforma los equilibrios de complejación, comparándolo con el comportamiento visto para un electrodo de gota de mercurio; entonces, investigamos la complejación del glutatión por plomo llevando a cabo las valoraciones voltamperométricas habituales.

Señal del metal libre

En el artículo 11.4 se observó que los metales Pb(II), Cd(II) y Zn(II) tenían un comportamiento diferente en un BiFE según su solubilidad en bismuto. En consecuencia, en el presente artículo decidimos estudiar los dos casos extremos por la técnica de voltamperometría diferencial de impulsos, la habitual en los estudios de complejación presentados en esta tesis.

Los resultados obtenidos para las valoraciones realizadas son los mismos que entonces, esto es, un pico único para el plomo -cuya solubilidad en bismuto es elevada- y un desdoblamiento de señales conforme aumenta la concentración de cadmio -cuya solubilidad es cero-, apareciendo el segundo pico a potenciales más negativos (fig. 1). Además, en ambos casos el área de los voltamperogramas es lineal con la concentración de metal en un intervalo muy amplio, concretamente entre los valores 5×10^{-7} y 1×10^{-4} mol L⁻¹.

La única diferencia apreciable entre las técnicas de redisolución (DPASV y CCSCP) y DPV es que ahora el análisis MCR-ALS de la valoración de cadmio sugiere que su interacción con las dos capas de bismuto no está tan diferenciada, aunque la primera señal también tiende a estabilizarse cuando surge el pico situado a potenciales más negativos. Probablemente, esto se deba a la mayor concentración de metal en la celda electroquímica, de forma que el cadmio solubilizado en la película de bismuto es mayor para los mismos tiempos de reducción.

Señal del ligando libre

Los ligandos con grupos tiol parecen favorecer tanto la oxidación del bismuto como la del mercurio. Por lo tanto, las fitoquelatinas originan una señal de reducción como ligando libre (fig. 2), pero a diferencia de las vistas al utilizar un electrodo de mercurio, presentan formas muy irregulares que se extienden sobre un intervalo de potenciales mucho más amplio. Este tipo de señales sin forma de pico puede deberse a la adsorción de las PC sobre la película de bismuto -adsorción creciente con el tamaño del ligando-, como sugieren las medidas realizadas mediante voltamperometría de eliminación con barrido lineal (EVLS) [26, 27].

Para profundizar en el comportamiento electroquímico del ligando que nos interesa estudiar después, llevamos a cabo sendas valoraciones de glutatión en SMDE y BiFE (fig. 3), observándose cambios en su señal conforme aumenta la concentración añadida. Sin embargo, mientras en el electrodo de mercurio se produce un solapamiento de señales DPV típicas y el área de los voltamperogramas es lineal con la concentración en todo el rango estudiado, en el electrodo de bismuto los cambios en la forma de la señal son continuos y sólo se cumple la linealidad entre 2×10^{-7} y $7,5 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

Señales de enlaces Pb-tiol y anódicas asociadas

Realizamos diversos experimentos con diferentes ligandos tiólicos para estudiar su comportamiento al complejarse con Pb(II), tanto en electrodo SMDE como BiFE. A modo de ejemplo, en la figura 4 se presentan la formación completa de los complejos Pb(GSH)₂ y Pb(PC)₂, además de la señal del ion Pb²⁺ libre por ser aquella con la que se solapan las señales anódicas asociadas a la formación de complejos.

De estos experimentos se concluye que al utilizar un electrodo de bismuto se forman tanto señales de reducción para los enlaces Pb-tiol como señales anódicas asociadas a su intercambio con el ion Bi³⁺, lo cual era previsible pues este tipo de ligandos también favorece la oxidación del material del electrodo. Además, estas señales anódicas se solapan con la señal del plomo libre, si bien de forma muy variable según el ligando estudiado. Respecto a la señal de reducción del complejo, su comportamiento electroquímico es inerte pero con un carácter marcadamente más irreversible en el

electrodo de bismuto que en el de mercurio, como se refleja en las alturas respectivas de sus señales.

Conclusiones del estudio previo

El uso de un electrodo de bismuto afecta de manera contradictoria al análisis MCR-ALS de valoraciones voltamperométricas. Por un lado, la presencia de un pico único de reducción del plomo facilita el estudio pero, por otro, el continuo cambio de forma de la señal anódica del ligando libre impide la aplicación del método MCR (donde cada especie química ha de tener un voltamperograma unitario único), a no ser que se realicen las valoraciones a concentraciones iniciales bastante menores que las que habitualmente utilizamos. Desgraciadamente, dado el carácter irreversible de las señales de los complejos PC/Pb(II), a esas concentraciones iniciales no alcanzaríamos la sensibilidad mínima para apreciarlos.

A pesar de la contrariedad que supone no poder estudiar las valoraciones voltamperométricas por MCR-ALS, el menor solapamiento de las señales anódicas puede permitir un estudio cualitativo de los sistemas PC/Pb(II) y, tal vez, concluir en algún modelo de complejación.

Estudio del sistema GSH / Pb(II)

En la valoración de GSH con Pb^{2+} realizada en el electrodo de gota de mercurio (fig. 5a) existe un solapamiento prácticamente total entre la señal anódica del complejo (1) y la del plomo libre (2), y entre la señal del ligando libre (3) y la del complejo (4). La aplicación de MCR-ALS no proporciona ningún resultado válido debido a la alteración de los perfiles de concentración que provocan solapamientos tan fuertes y, de hecho, ni siquiera un análisis visual permite la dilucidación simple de una secuencia de complejación.

Sin embargo, la misma valoración realizada con un BiFE muestra un solapamiento mucho menor entre las señales 1 y 2, así como una señal del complejo prácticamente aislada desde las primeras adiciones (fig. 5b). Además, el electrodo de bismuto permite

una clara diferenciación entre el plomo débilmente enlazado y el que queda como ion libre.

Para seguir mejor la evolución de las diferentes especies químicas, escogemos unos pocos voltamperogramas según un valor de ratio $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{GSH}]$ creciente y se representan en la figura 6a. Al principio de la valoración, tan sólo observamos la señal irregular del GSH libre (3) que va desapareciendo al añadir Pb(II) para surgir un complejo (4) y su señal anódica asociada (1). La señal de dicho complejo crece hasta ratio 0,5 y luego mantiene el valor de su intensidad, con lo que parece formarse un complejo $\text{Pb}(\text{GSH})_2$ en el cual el ion plomo estaría unido al grupo tiol de cada molécula de glutatión (equilibrio A en fig. 6b). Este complejo sería electroquímicamente inerte pues su señal se mantiene a un potencial de pico constante.

Conforme avanza la valoración, aparece la señal del metal que se mantiene a un potencial constante entre ratio $[\text{Pb}^{2+}]/[\text{GSH}]$ 0,5 y 1, pero que luego sufre un fuerte desplazamiento a potenciales menos negativos (señales 4' y 4). Esto indicaría la presencia de una unión débil $\text{Pb}-\text{COO}^-$ y, por lo tanto, de la formación de un complejo $\text{Pb}_2(\text{GSH})_2$ electroquímicamente lábil, pues aparte del desplazamiento de la señal del plomo libre, también se observa un ligero desplazamiento de la señal del complejo ya formado (4).

Referencias V

1. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *J. Electroanal. Chem.*, 516 (2001) 110.
2. S. Nigam, A. de Juan, R. J. Stubbs, S. C. Rutan, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 477.
3. S. Navea, A. de Juan, R. Tauler, *Anal. Chim. Acta*, 446 (2001) 187.
4. B. S. Grabaric, Z. Grabaric, R. Tauler, M. Esteban, E. Casassas, *Anal. Chim. Acta*, 341 (1997) 105.
5. M. Fernández, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 505 (2001) 44.
6. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *Analyst*, 127 (2002) 401.
7. F. M. M. Morel, A. M. L. Kraepiel, M. Amyot, *Annu. Rev. Ecol. Syst.*, 29 (1998) 543.
8. Directive 2002/95/EC of the European Parliament and of the Council of 27 January 2003 on the restriction of the use of certain hazardous substances in electrical and electronic equipment.
9. <http://www.socopse.se/download/18.3cd20f1b1243376c1168000581/SR-Mercury.pdf>, consultado el 30 de Noviembre de 2010.
10. I. Svancara, Ch. Prior, S. B. Hocevar, J. Wang, *Electroanalysis*, 22 (2010) 1405.
11. F. A. Cotton. *Advanced Inorganic Chemistry*, John Wiley & Sons, New York, 6th Ed. (1999).
12. F. Berbel, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 432 (1997) 243.
13. J. Mendieta, M. S. Díaz-Cruz, A. Monjonell, R. Tauler, M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 390 (1999) 15.
14. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Electroanalysis*, 15 (2003) 1177.
15. R. Gusmão, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.*, 394 (2009) 1137.
16. L.D. Pettit, K. Powell, IUPAC Stability Constants Database, v. 5.16, Academic Software, Otley (2001).

17. Ü. A. Kirgöz, S. Marín, M. Pumera, A. Merkoçi, S. Alegret, *Electroanalysis*, 17 (2005) 881.
18. A. Królicka, A. Bobrowski, A. Kowal, *Electroanalysis*, 18 (2006) 1649.
19. J. Jia, L. Cao, Z. Wang, *Electroanalysis*, 19 (2007) 1845.
20. *ASM Handbook, vol. 3, Alloy phase diagrams*, ASM International, Ohio, 10th (1992).
21. S. C. Petrovic, H. D. Dewald, *Anal. Chim. Acta*, 357 (1997) 33.
22. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, I. Šestáková, J. Velek, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 520 (2002) 111.
23. E. Chekmeneva, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 43 (2009) 7010.
24. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, I. Šestáková, J. Velek, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 520 (2002) 111.
25. B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 39 (2005) 778.
26. O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.*, 402 (1996) 19.
27. L. Trnkova, O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.*, 403 (1996) 123.

Parte VI

CONCLUSIONES

Conclusiones

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

- 1- La obtención de modelos de complejación para sistemas PC / Pb(II) basándose en la realización de valoraciones polarográficas y su análisis mediante resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) no proporciona unos resultados tan satisfactorios como los obtenidos para los sistemas con Cd(II) o Zn(II); por contra, y teniendo en cuenta los problemas vistos, hay que reconocer la solvencia de esta metodología para proponer estructuras tentativas de la mayoría de los sistemas estudiados.
- 2- Estos problemas son, básicamente, el desplazamiento lateral de señales y el solapamiento de señales. El primero supone la necesidad de realizar el análisis quimiométrico con componentes que expliquen estos desplazamientos, perdiéndose a veces la correlación componente - proceso electroquímico; aun no ocurriendo esto, la variabilidad que representa el desplazamiento de señales polarográficas parece insuficiente para obtener una correcta resolución mediante MCR-ALS. El segundo problema, favorecido por la interferencia de las señales anódicas, provoca la distorsión de los perfiles de concentración y dificulta la obtención exacta de estequiometrías, tanto más cuanto mayor es el solapamiento entre señales en la ventana voltamperométrica o de concentraciones.

- 3- El análisis MCR-ALS de matrices que contienen datos voltamperométricos (DPP) y espectroscópicos (CD) es efectivo para resolver el problema del desplazamiento de potencial cuando su causa conlleva también un cambio en los espectros. En lo referente al solapamiento de señales, esta metodología también resulta efectiva para mejorar la resolución de los perfiles puros de aquellos componentes que son especies activas en la técnica espectroscópica. Estos dos hechos, resultado de la independencia y complementación de la información que cada técnica aporta, concurren en la proposición de modelos de complejación más completos y sólidos que los que se obtendrían del análisis particular de las respuestas de cada técnica.
- 4- Concretamente, el desplazamiento lateral que sufre la señal del complejo $\text{Cd}(\text{CG})_2$ se debe a la formación sucesiva de un complejo lábil $\text{Cd}_2(\text{CG})_2$ en el cual existen uniones $\text{Cd}-\text{COO}^-$, mientras que el desplazamiento de la señal del complejo $\text{Pb}(\text{PC}_3)$ se debe a un cambio en la fortaleza del enlace $\text{Cys}-\text{Pb}-\text{Cys}$ favorecido por una variación en la conformación espacial del complejo en presencia del ion Pb^{2+} libre. Así pues, en el primer caso el desplazamiento de la señal se debe a un nuevo proceso electroquímico y en el segundo caso no, pero en ambos el análisis MCR-ALS de matrices espectro-voltamperométricas ayuda a discriminar entre posibles artefactos electroquímicos y fenómenos intrínsecos a la complejación.
- 5- El programa *shiftfit* combina diferentes aspectos de las aproximaciones *hard-* y *soft modelling* para corregir el movimiento lateral de señales incluso en el caso de existir un fuerte solapamiento con otras. Este programa sólo está limitado por la invariabilidad de la forma de las señales durante su desplazamiento y, de hecho, podría aplicarse a muchas otras técnicas siempre que sólo varíe la posición de sus señales en el eje x.
- 6- En el caso de determinar constantes de estabilidad de complejos lábiles o parcialmente lábiles, *shiftfit* ofrece resultados que, ajustados mediante *hard modelling*, resultan más cercanos a los teóricos y con un error de aplicación menor que cuando se calculan a través de la factorización MCR-ALS de la matriz experimental.

- 7- En el caso de dilucidar modelos de complejación, *shiftfit* también resulta de gran ayuda al proporcionar una matriz corregida donde las señales presentan un valor fijo de potencial y, por tanto, una linealidad incrementada respecto a la matriz experimental. Puesto que las señales de cada voltamperograma se corrigen simultáneamente, la aplicación de *shiftfit* queda sujeta a la inclusión de todas las especies químicas básicas que conforman los equilibrios de complejación.
- 8- La interacción de los distintos metales estudiados con la película de bismuto depende de su solubilidad en este material y, presumiblemente, así puede ocurrir con otros metales. Cuando ésta es alta (plomo) se origina una señal única, y cuando es baja (cadmio y zinc) se produce un desdoblamiento de señales a altas concentraciones de metal, tanto en técnicas de redisolución (DPASV y CCSCP) como en DPV. La coexistencia de dos señales no impide la determinación de metales en un rango de concentraciones bastante más amplio que el habitual, pues el área total de las dos señales solapadas es también linealmente dependiente con la concentración de analito.
- 9- Los ligandos con grupos tiol favorecen la oxidación del bismuto, por lo que los sistemas PC / Pb(II) estudiados en un electrodo de película de bismuto originan señales anódicas para el ligando libre y complejado, igual que en un electrodo de mercurio.
- 10- En el marco de esta tesis doctoral, el electrodo de bismuto no se puede considerar una auténtica alternativa al electrodo de mercurio, ya que el carácter irreversible de las señales de los complejos unido a la falta de linealidad de la señal anódica del ligando impiden el análisis MCR-ALS de las valoraciones voltamperométricas. Sin embargo, la mayor dependencia señal - especiación del metal y el menor solapamiento de las señales anódicas ofrecidas por el BiFE permiten un correcto estudio desde un punto de vista cualitativo del sistema GSH / Pb(II) y, posiblemente, para otros sistemas parecidos se puede extraer información similar o incluso complementaria a la que proporcione un electrodo SDME.

- 11-** Se ha reconocido la formación de enlaces Cys-Pb-Cys y Pb-Cys. El primero de ellos muestra una gran fortaleza y tendencia a formarse (preferentemente con grupos tiol pertenecientes al mismo ligando), pero el enlace con un solo resto de cisteína resulta débil y no se advierte en ningún estudio la rotura de un enlace Cys-Pb-Cys para formar dos enlaces Cys-Pb. La presencia en el medio de moléculas que interaccionan con el ion Pb(II) probablemente ayude a la formación del enlace Pb-Cys, aunque se necesitan estudios más completos para verificarlo.
- 12-** Como en los sistemas estudiados anteriormente con Cd(II) o Zn(II), la unión Pb-COO⁻ parece formarse únicamente a partir de complejos ML₂ (caso del glutatión o sus fragmentos), es decir, cuando el metal puede unirse a dos grupos carboxilato terminales. Para poder afirmar con más seguridad este hecho se necesitan estudios complementarios, como pudieran ser el análisis de los sistemas Cys-Gly/Pb(II) y γ -Glu-Cys/Pb(II) utilizando un electrodo de película de bismuto o la utilización de alguna técnica espectroscópica en la cual la concentración inicial de ligando no tenga que ser tan diferente a la utilizada en voltamperometría. En todo caso, la formación de estos complejos M₂L₂ cuando el ligando es pequeño podría tener su importancia en la biosíntesis y mecanismo de actuación de las fitoquelatinas.

Formulación del programa *Shiftfit*

```
function [deltaE,Icor,Irep,c]=shiftfit(Ishift,esv,E,issshift);

% shiftfit, by J.M. Diaz, May 2006; requires shiftcalc
%
% corrects the matrix for the potential shift of one or more
components (deltaE)
%
% esv (in column-wise form) is the estimation of the unit
voltammograms at the reference potentials
% Icor, Irep are the corrected and reproduced matrices, respectively
% c is an estimation of concentration profiles (in arbitrary units)
% E is the potential vector (in a column)
% issshift is a vector in the form [1,0,0,1,...] which denotes with
'1' the components that
% will be corrected for the potential shift
%
% function [deltaE,Icor,Irep,c]=shiftfit(Ishift,esv,E,issshift);

%checking dimensions

[nexp,npot]=size(Ishift);
[npot2,ncomp]=size(esv);
[npot3,nothing]=size(E);
if npot2~=npot, error('Ishift and esv dimensions must agree');end
if npot3~=npot, error('Ishift and E dimensions must agree');end

%normalized variable number of column

for i=1:npot,x(i,1)=i/npot;end

%normalization of Ishift and esv (Ishiftn and v)
maxI=max(max(Ishift));
Ishiftn=Ishift./maxI;
maxv=max(max(esv));
v=esv./maxv;
%conversion factor between delta(=f(x)) and deltaE(=f(E))
```



```

factorE=max(E)-min(E);

%estimation of delta0 (in the units of the normalized variable x)

delta0=zeros(nexp,ncomp);

%generation of different filters to be used in Savitzky-Golay 2nd
derivative

fil63=cgolay(6,3,2);
fil32=cgolay(3,2,2);

for i=2:nexp
    for k=1:ncomp
        if isshift(1,k)==1
            v2=v(:,k);
            % selecting the parts of the initial estimation where the peak
            is more than 20% of the maximum
            ipeakselect=find(v2>0.2*max(v2));

x3=x(ipeakselect);v3=v2(ipeakselect);I3=(Ishiftn(i,ipeakselect));
            %looking for the second derivative by Savitzky-Golay if there
            are enough points in the range I3
            [nrI3,ncI3]=size(I3);
            if ncI3>20, dI3=(golay(fil63,I3'))';
            elseif ncI3>9, dI3=(golay(fil32,I3'))';
            elseif ncI3<=9, dI3=zeros(1,ncI3);
            end
            %subplot(2,1,1);plot(I3,'o');subplot(2,1,2);plot(dI3,'o');pause
            %looking for maxima in the experimental matrix
            [ymax,imax]=max(I3);
            %testing if there is a relative or an absolute maximum (in the
            last case the range is shortened)
            if dI3(imax)>0,
                iderselect=find(dI3<0);
                if isempty(iderselect)==0;

x3=x(iderselect);v3=v2(iderselect);I3=(Ishiftn(i,iderselect));
                %subplot(1,1,1);plot(I3,'o');pause
                [ymax,imax]=max(I3);
                else delta0(i,k)=0;
                end
            end
            %the maximum of the estimated unit voltammogram
            [yesmax,iesmax]=max(v3);
            if ymax>0.05, delta0(i,k)=x3(imax)-x3(iesmax); end
            else delta0(i,k)=0;
            end
        end
    end
end

plot(factorE*delta0,'o');xlabel('Experiment number');ylabel('deltaE0 /
V');title('initial estimation of deltaE: press any key');pause

%estimation of c

for i=1:nexp
    for k=1:ncomp,
        if delta0(i,k)~=0 & isshift(1,k)==1, xshift=x-delta0(i,k);

```

```

        vshift(:,k)=spline(x,v(:,k),xshift);
    else vshift(:,k)=v(:,k);
    end
end
c(i,:)=negtozero(Ishiftn(i,:)/vshift');
end

%fitting
options=optimset('Display','off','Diagnostics','off','LevenbergMarquardt','on','MaxIter',50,'TolX',0.001,'TolFun',0.001);

for i=2:nexp
    cv=[isshift;c(i,:);v];

    [delta(i,:)] = lsqcurvefit('shiftcalc',delta0(i,:),cv,Ishiftn(i,:),0,0.3, options);
end

%conversion to deltaE

deltaE=delta*factorE;

plot(deltaE,'o');xlabel('Experiment number');ylabel('deltaE / V');title('fitted values of deltaE: press any key');pause

%corrected matrix (Icor),

for i=1:nexp
    for k=1:ncomp,
        if delta(i,k)~=0, xshift=x-delta(i,k);
            vshift(:,k)=spline(x,v(:,k),xshift);
        else vshift(:,k)=v(:,k);
        end
    end
    c(i,:)=negtozero(Ishiftn(i,:)/vshift');
end

Icor=maxI*c*v';

%reproduced matrix (Irep) and lack of fit between Irep and Ishift

for i=1:nexp,Irep(i,:)=maxI*shiftcalc(delta(i,:),[isshift;c(i,:);v]);
end

ss1=0;ss2=0;
for i=1:nexp
    for j=1:npot
        ss1=ss1+(Ishift(i,j)-Irep(i,j))^2;
        ss2=ss2+(Ishift(i,j))^2;
    end
end

lof=((ss1/ss2)^0.5)*100;

```

```
format short
```

```
disp(' ');disp('lack of fit (%) : ');disp(lof)
```

```
plot(c);title('fitted concentration / a.u.: press any  
key');xlabel('number of experiment');pause
```

```
subplot(3,1,1);plot(-E,Ishift);title('experimental  
matrix');ylabel('current / A');  
subplot(3,1,2);plot(-E,Irep);title('reproduced  
matrix');ylabel('current / A');  
subplot(3,1,3);plot(-E,Icor);title('corrected matrix');xlabel('-E /  
V');ylabel('current / A');
```

Abreviaturas

Acrónimos

Alternating Current Polarography	ACP	Polarografía de corriente alterna
Stripping Chronopotentiometry with Adsorptive Accumulation	AdSCP	Cronopotenciometría de redisolución con acumulación por adsorción
Atomic Force Microscopy	AFM	Microscopía de fuerza atómica
Alternating Least Squares	ALS	Mínimos cuadrados alternados
Anodic Stripping Voltammetry	ASV	Voltamperometría de redisolución anódica
Bismuth Film Electrode	BiFE	Electrodo de película de bismuto
Constant-Current Stripping Chronopotentiometry	CCSCP	Cronopotenciometría de redisolución a intensidad constante
Glassy Carbon	CG	Carbono vitrificado
Circular Dichroism	CG	Dicroísmo circular
Cyclic Voltammetry	CV	Voltamperometría cíclica
Drop 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

Electrospray Ionization Mass Spectrometry	ESI-MS	Espectrometría de masas de ionización por electrospray
Elimination Voltammetry with Linear Scan	EVLS	Voltamperometría de eliminación con barrido lineal
Extended X-Ray Absorption Fine Structure	EXAFS	Espectroscopia de rayos X de estructura fina
Hanging Mercury Drop Electrode	HMDE	Electrodo de gotas de mercurio colgante
High Performance Liquid Chromatography	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
Hard-Soft Acid-Base	HSAB	ácido-base blando-duro
Isothermal Titration Calorimetry	ITC	Valoración isotérmica calorimétrica
lack of fit	lof	falta de ajuste
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization - Time-Of-Flight	MALDI-TOF	Desorción/ionización láser asistida por matriz - Tiempo de vuelo
Multivariate Curve Resolution	MCR	Resolución multivariante de curvas
Phytochelatin Synthase	PCS	Fitoquelatín sintasa
Scanning Electron Microscopy	SEM	Microscopía electrónica de barrido
Simple-to-use Interactive Self-modeling Analysis	SIMPLISMA	-----
Static Mercury Drop Electrode	SMDE	Electrodo de gotas de mercurio estático
Singular Value Decomposition	SVD	Descomposición en valores singulares
Ultraviolet Spectroscopy	UV	Espectroscopia ultravioleta

Sustancias

Ala	Alanina
Bis-TRIS	Bis(2-hidroximetil)imino-Tris(hidroximetil)metano
Bis-TRIS propano	1,3-bis(tris(hidroximetil)metilamin) propano
Cys	Cisteína
DMPS	Sal sódica del ácido 2,3-dimercapto-1-propansulfónico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EDDS	Ácido etilendiaminodisuccínico
GSH	Glutación
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
HEDTA	Ácido hidroxietilendiaminotriacético
HBED	Ácido N,N'-Bis(2-hidroxibenzil)etilendiaminodiacético
NTA	Ácido nitrilotriacético
PC	Fitoquelatinas
PIPES	Ácido 1,4-piperazindietanosulfónico
TRIS	Tris-(hidroximetil)-aminometano

Agradecimientos

He empezado muchas veces estos agradecimientos pero no hay forma de acabarlos. Al obligarme a echar la vista atrás, a todos estos años que no han sido buenos, la operación, la larguísima recuperación, el dolor continuo, la psique quebrada, la incompreensión general, la asunción de que las cosas no serán como imaginaste y el sentimiento de profunda soledad que conlleva, y esto y aquello y lo de más allá, me estaban quedando unos agradecimientos muy amargos. No es plan. A fin de cuentas, esto se escribe sólo para significar a las personas que, de alguna manera, me han ayudado en mi trabajo, que han estirado conmigo de la coleta (bromas sobre mi estado capilar, las justas) y me han ayudado a sacarme junto a mi caballo del lago. Gente a la que aprecio, incluso quiero, así que mejor dejar los recuerdos y ponerse manos a la obra.

GRACIAS:

A mis directores de tesis, Cristina y José Manuel, con los que he protagonizado un auténtico *remake* de “El tormento y el éxtasis”, sin ser mi obra la Capilla Sixtina ni su carácter el de Julio II. Al contrario, han demostrado tener buenas dosis de paciencia, conjugar libertad dada con un sentido práctico del que yo carezco, y una cercanía en el trato muy gratificante. De la labor científica, y junto al Dr. Esteban, da buena cuenta la presente memoria.

Al Dr. Tauler y, especialmente, a la Dra. de Juan por sacarnos de algún que otro atolladero. Me fascina la combinación de inteligencia para lo abstracto y didactismo sencillo.

A mi prima María por el dibujo de la portada y a mi mamá por la figura 3 del capítulo 1.

A mis compañeros pasados y presentes del Grupo de Electroanálisis. Esto es como la lista de invitados en las bodas, pobre de ti si te olvidas a alguien, y con razón. Así que es mejor no nombrar a nadie -pero ellos saben quiénes y en qué medida- excepto a las que sucumbieron más tarde o más temprano a mis muchos encantos y acabaron cruzando el Rubicón, de la orilla del compañerismo a la de la amistad.

Si alguien ha sido mis ojos y mis oídos durante estos años, si alguien me ha ahorrado viajes sorteando la fabulosa burocracia, esa es Núria, la muy Dra. Serrano. Y con la anómala sensación de que no te piden nada a cambio. Hemos alumbrado, además, dos criaturas -probablemente mostrencas- que espero sean el inicio de más colaboraciones. En lo personal, aunque ha costado Dios y ayuda, aquí la tenemos, la misma pero más cálida, también más vulnerable. Una amiga.

A Olga, la chica tetranómica: guapa, simpática, inteligente y culta. Nos entendimos bien desde el principio, por lo que ha tenido mucho tiempo para sufrirme, principalmente con todo aquello que tuviera una ligera apariencia de informática. Me dejás buenos momentos, conversaciones, mucha complicidad y, sobre todo, la risa. La capacidad de reírnos de todo -de nosotros mismos, lo primero- es algo que escasea.

A todas las personas con las que trabajé en la Biblioteca de la Facultad, seis meses que no olvidaré nunca. No es sólo lo afectuoso del trato personal, la alta confianza en mi trabajo y mi primer sueldo digno (dignísimo), fue una inyección de entusiasmo en un momento crucial de mi vida. Aunque tampoco tengan que ver directamente con esta tesis, mi gratitud a Albert Cots por idénticos motivos y al Dr. Ferran J. García por poner límites y nombres a muchos aspectos de lo que no funciona en mi salud.

Por último y más importante, gracias a mis padres. Cuando todo se tuerce, cuando el suelo que pisas se hunde, cuando no hay a qué agarrarte, descubres que tienes un pilar que te sostiene, más sólido aún de lo que creías; y eso te permite renacer. Esta tesis es enteramente suya, por todos los viajes a la facultad, por su capacidad de sacrificio y su

Amor, por su decidido esfuerzo a hacerme sentir mejor en todos los aspectos. No es porque sean padres, sobresalen a cualesquier otros que conozca, incluso de oídas. Y como quien puede lo más puede lo menos, ¿para qué adjetivar hechos pequeños? Eso me parecía.

Notas

