Universitat de Barcelona

Complejación de iones metálicos con mezclas de fitoquelatinas, sus fragmentos y selenocistina. Estudio mediante voltamperometría - resolución multivariante de curvas, en combinación con técnicas espectrométricas y calorimétricas

Rui Jorge Coelho Gusmão

Departament de Química Analítica

Facultat de Química

Barcelona, 2012

Programa de Doctorado

Química Analítica del Medi Ambient i de la Pol·lució (Bienni 2007-2009)

Complejación de iones metálicos con mezclas de fitoquelatinas, sus fragmentos y selenocistina. Estudio mediante voltamperometría - resolución multivariante de curvas, en combinación con técnicas espectrométricas y calorimétricas

Memoria presentada por Rui Jorge Coelho Gusmão

para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona

El Dr. Miquel Esteban y el Dr. José Manuel Díaz Cruz,

CERTIFICAN

que la presente tesis doctoral, titulada "*Complejación de iones metálicos con mezclas de fitoquelatinas, sus fragmentos y selenocistina. Estudio mediante voltamperometría - resolución multivariante de curvas, en combinación con técnicas espectrométricas y calorimétricas*", ha sido realizada por Rui Jorge Coelho Gusmão bajo nuestra dirección en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Octubre de 2012

Dr. Miquel Esteban Cortada

Catedrático 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

Índice

Objetivos i

Estructura y contenidos ix

Acrónimos xii

Sustancias xv

Agradecimientos xvii

Parte I. Introducción 1

Capítulo 1. Los metales en el medio ambiente 3

1.1 Importancia del análisis de los metales pesados 5

1.2 Toxicidad y bioacumulación de los metales pesados 5

1.2.1 Factores abióticos 6

1.2.1.1 Factores inherentes al metal 6

1.2.1.2 Factores físico-químicos ambientales 6

1.2.2 Factores bióticos 8

1.3 Metales pesados objeto de estudio 8

1.3.1 Cadmio 9

1.3.2 Mercurio 10

1.3.3 Plomo 10

1.3.4 Zinc 11

1.4 Referencias 11

Capítulo 2. Compuestos estudiados 15
2.1 Propiedades fisicoquímicas de S y Se 17
2.2 Tioles 19
2.2.1 Cisteína 20
2.2.2 Glutatión 20
2.2.3 Fitoquelatinas 21
2.2.3.1 Mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas 22
2.2.3.2 Mecanismo de detoxificación de metales por fitoquelatinas 23
2.2.3.3 Fitoquelatinas y fitorremediación 24
2.3 Selenio 25
2.3.1 Selenio en el medio ambiente 25
2.3.2 Plantas 27
2.3.3 Relevancia biológica del Se 28
2.4 Referencias 30

Capítulo 3. Técnicas instrumentales y tratamiento de datos 33
3.1 Técnicas electroanalíticas 35
3.1.1 Técnicas voltamperométricas 35
3.1.1.1 Voltamperometría diferencial de impulsos 36
3.1.1.2 Voltamperometría de onda cuadrada 37
3.1.1.3 Voltamperometría cíclica 38
3.1.2 Electrodos de trabajo 39
3.1.2.1 Electrodo de Hg 39
3.1.2.2 Electrodos sólidos 40
3.1.3 Aplicación de la voltamperometría en los estudios de complejación 40
3.1.3.1 Caso de complejo inerte 42
3.1.3.2 Caso de complejo lábil 43
3.1.3.3 Efecto del pH en los voltamperogramas 44
3.1.4 Determinación electroquímica de tioles 44
3.1.5 Determinación electroquímica de las distintas especies de selenio 45

3.2 Dicroísmo Circular 51
3.2.1 Aspectos generales del dicroísmo circular 51
3.2.2 Aplicaciones del dicroísmo circular 53
3.3 Espectrometría de masas 54
3.3.1 Ionización por electronebulización 55
3.3.2 Analizadores de masas 56
3.3.3 Aplicación de ESI-MS en los estudios de especiación 58
3.4 Técnicas calorimétricas 59
3.4.1 La compensación entre entalpía y entropía 60
3.4.2 Valoración isotérmica calorimétrica 60
3.4.3 Aplicaciones de ITC en estudios de complejación 62
3.5 Métodos quimiométricos 63
3.5.1 *Hard-modelling* y *soft-modelling* 63
3.5.2 Resolución multivariante de Curvas con optimización mediante mínimos cuadrados alternados, MCR-ALS 65
3.5.3 Aplicaciones para el análisis cualitativo 69
3.5.4 Nuevas estrategias y herramientas 71
3.5.4.1 *Shiftfit* 71
3.5.4.2 *pHfit* 72
3.5.4.3 Ajuste mediante picos gausianos 75
3.6 Referencias 77

Parte II. Experimental 83

Capítulo 4. Instrumentación y reactivos 85
4.1 Instrumentación 87
4.1.1 Instrumentación electroquímica 87
4.1.2 Instrumentación de dicroísmo circular 88

4.1.3 Instrumentación de espectrometría de masas 89
4.1.4 Instrumentación microcalorimétrica 90
4.2 Reactivos y disoluciones 91
4.2.1 Reactivos 91
4.2.2 Preparación de las disoluciones 93

Capítulo 5. Procedimientos experimentales 95
5.1 Valoraciones por polarografia de impulsos diferencial 97
5.2 Valoraciones por dicroísmo circular 97
5.3 Medidas por espectrometría de masas 98
5.4 Valoración isotérmica calorimétrica 98

Parte III. Resultados y Discusión 99

Capítulo 6. Complejación competitiva de Cd^{2+} con fragmentos de fitoquelatina de cadena corta mediante DPP– MCR-ALS y ESI-MS: influencia de la longitud de cadena 101
6.1 Introducción 103
6.2 *Competitive binding of Cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by Multivariate Curve Resolution*. 103
6.3 *Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: A voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry* 117
6.4 *Electrochemichal Survey of the Chain Length Influence on the Competitive Binding of Cadmium by Phytochelatins* 131
6.5 Discusión de resultados 147
6.6 Referencias 149

Capítulo 7. Estudio combinado de la complejación de Cd^{2+} y Pb^{2+} con la fitoquelatina PC_5 mediante DPP/CD – MCR-ALS y ESI-MS 151

7.1 Introducción 153

7.2 *Circular Dichroism and Voltammetry, assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC_5* 153

7.3 Discusión de resultados 175

7.4 Referencias 176

Capítulo 8. Estudio de complejación de la selenocistina 177

8.1 Introducción 179

8.2 *Chemometric analysis of voltammetric data on metal ion binding by Selenocystine.* 180

8.3 *Combination of chemometrically-assisted voltammetry, calorimetry and circular dichroism as a new methodology for the study of bioinorganic substances. Application to selenocystine metal complexes.* 195

8.4 Discusión de resultados 219

8.5 Referencias 222

Capítulo 9. Electron transfer to and from Ferrocene bound at a non-uniform electrode surface: theory and experiment 225

9.1 Introduction 227

9.1.1 Carbon Based Electrodes 228

9.1.2 Electrode Surface Modification 230

9.2 Results and Discussion 231

9.2.1 Presentation of the work and objectives 231

9.2.1.1 Application of the Marcus–Hush–Chidsey model to surface-bound redox couples 231

9.2.1.2 “Clicking” functionality onto electrode surfaces 232

9.2.2 *Marcus–Hush–Chidsey theory of electron transfer to and from species bound at a non-uniform electrode surface: Theory and experiment* 235
9.2.3 Oxidation of Fc-modified electrode in alkyl cyanides 243
9.2.4 Analytical performance for Cys determination 245
9.3 Conclusions 246
9.4 References 247

Apendix 1 251
A.1 Butler-Volmer Kinetics 253
A.2 Marcus-Hush-Chidsey theory of electron transfer applied to voltammetry 254
A.3 References 257

Parte IV. Conclusiones 261

Objetivos

El objetivo principal de la Tesis ha sido profundizar en el conocimiento de la complejación de metales por ligandos de S y Se. Se ha dedicado una atención especial a las fitoquelatinas (PC_n), que son la base de la fitorremediación, por su capacidad de complejar los metales pesados. Se ha intentado conocer los complejos formados, mediante experimentos realizados con diferentes técnicas analíticas.

En una primera fase, el trabajo se centra en el uso de la polarografia de impulsos diferencial (DPP) asistida con el método quimiométrico de Resolución Multivariante de Curvas por Mínimos Cuadrados Alternados (MCR-ALS) para resolver las mezclas de péptidos presentes en plantas (fitoquelatinas y sus fragmentos) y Cd^{2+}. Los resultados obtenidos se han comparado con los obtenidos por la espectrometría de masas (ESI-MS).

El siguiente objetivo fue estudiar la fitoquelatina PC_5, en presencia de los iones Cd^{2+} y Pb^{2+}. El mayor tamaño de este péptido, respecto a otras PC_n estudiadas anteriormente, podria implicar *a priori* modelos de complejación competitiva más complejos. Por ello, se planteó un estudio sistemático basado en una combinación del análisis quimiométrico (mediante MCR-ALS y los nuevos algoritmos *pHfit* y GPA) de las medidas por DPP y Dicroísmo Circular (CD), y ESI-MS.

El tercer objetivo fue estudiar la selenocistina (SeCyst), en diversas situaciones de complejación competitiva. El comportamiento electrónico de SeCyst sola o en presencia de un ion metálico (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+} , Cr^{3+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+}) fue estudiado por DPP en un amplio intervalo de pH. Se han realizado también estudios por Valoración Isotérmica Calorimétrica (ITC) a pH fisiológico (7.4) que además, permitieron obtener parámetros termodinámicos y constante de complejación.

En un estudio más detallado, se seleccionó el Cd^{2+} como modelo para comportamiento de SeCyst en la presencia de un metal no esencial, en cambio, se eligió el Zn^{2+} para el caso de un elemento esencial. Además, se estudiaran mezclas de SeCyst y el glutatión (GSH) en presencia de Cd^{2+} a pH fisiológico.

Un último objetivo consistió en evaluar la posible utilización de electrodos modificados para la detección de tioles. En una estancia en la Universidad de Oxford, se llevaron a cabo estudios de modificación de dos tipos de electrodos de carbono: el de carbono vitrificado (GCE) y el de grafito pirolítico "*edge plane pyrolytic graphite*" (EPPG), inmovilizando en sus superficies un centro metálico redox (derivados del Ferroceno, Fc). Finalmente, se estudió su respuesta catalítica en presencia de Cys.

Objectius

L'objectiu principal de la Tesis ha estat aprofundir en el coneixement de la complexació de metalls per lligands de S i Se. S'ha dedicat una especial atenció a les fitoquelatines (PC_n), que són la base de la fitorremeiació per la seva capacitat de complexar metalls pesants. S'ha intentat conèixer els complexos formats, mitjançant diferents tècniques analítiques.

En una primera fase el treball se centrà en l'ús de la Polarografia d'Impulsos Diferencial (DPP), assistida per la Resolució Multivariant de Corbes per Mínims Quadrats Alternats (MCR-ALS), per resoldre les mescles de pèptids presents en plantes (fotoquelatines i llurs fragments) i Cd^{2+}. Els resultats obtinguts s'han comparat amb els de l'espectrometria de masses (ESI-MS).

El següent objectiu va ser estudiar la fitoquelatina PC_5 en presència de Cd^{2+} i Pb^{2+}. La mida més gran d'aquesta PC_n, respecte a d'altres estudiades anteriorment, podria implicar *a priori* models de complexació competitiva més complicats. Per això es va plantejar un estudi sistemàtic basat en la combinació de l'anàlisi quimiomètrica (mitjançant MCR-ALS i els nous algoritmes *pHfit* i GPA) de les dades obtingudes per DPP i per dicroisme circular, i ESI-MS.

Un tercer objectiu ha estat estudiar la selenocistina (SeCyst) en diverses situacions de complexació competitiva. El comportament electroquímic de la SeCyst sola o en presència d'un ió metàl·lic (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} i Zn^{2+}) ha estat estudiat per DPP en un ampli interval de pH. S'han realitzat també estudis per valoracions isotèrmiques calorimètriques (ITC) que han permès obtenir paràmetres termodinàmics i constants de complexació. En un estudi més detallat s'ha seleccionat el Cd^{2+} com model de metall no essencial i el Zn^{2+} com essencial per estudiar el seu comportament en presència de SeCyst. S'han estudiat també mescles de SeCyst i glutatió en presència de Cd^{2+} a pH fisiològic.

Un darrer objectiu ha estat avaluar la possible utilització d'elèctrodes modificats per a la detecció de tiols. En una estada a la Universitat d'Oxford es portaren a terme estudis de modificacions de dos tipus d'elèctrodes de carboni: el de carboni vitrificat (GCE) i el de grafit pirolític (EPPG, "edge plane pyrolitic graphite"), immobilitzant en llurs superfícies un centre metàl·lic redox (derivats del ferrocè, Fc). Finalment s'estudià llurs respostes catalítiques en presència de Cys.

Objectives

The main goal of the Thesis has been to deepen the knowledge about metal complexation by ligands containing S and Se. A special attention has been paid to phytochelatins (PC_n), which are on the basis of phytoremediation due to their ability to complex heavy metals. The formed complexes have been studied by means of different analytical techniques.

In a first step, the work is focused on the use of Differential Pulse Polarography (DPP), assisted by Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares (MCR-ALS), in order to resolve the mixtures of peptides present in plants (phytochelatins and their fragments) and Cd^{2+}. The obtained results have been compared with those by mass spectrometry (ESI-MS).

The next goal has been the study of the phytochelatin PC_5 in the presence of Cd^{2+} and Pb^{2+}. The bigger size of this PCn as compared to other previously studied could imply a priori more complicated models of competitive complexation. Then, a systematic study was devised based on the combination of chemometric analysis (by means of MCR-ALS and the new algorithms pHfit and GPA) of the data obtained by DPP and circular dichroism, and ESI-MS.

A third goal has been the study of selenocystine (SeCyst) in different situations of competitive complexation. The electrochemical behaviour of SeCyst alone or in the presence of a metal ion (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} and Zn^{2+}) has been studied by DPP in a wide pH range. Studies by isothermal titration calorimetry (ITC) have also been made, which have provided thermodynamic parameters and complexation constants. In a more detailed study, Cd^{2+} and Zn^{2+} ions have been selected as models of non-essential and essential metal, respectively, in order to study their behaviour in the presence of SeCyst. Mixtures of SeCyst and glutathione have been also studied in the presence of Cd^{2+} at physiological pH.

The last goal has been to evaluate the possible use of modified electrodes for the detection of thiols. During a stay in the University of Oxford, several studies were carried out on the modification of two kinds of carbon electrode: glassy carbon (GCE) and edge plane pyrolitic graphite (EPPG). The modification consisted on the immobilisation of a metallic redox center (a ferrocene derivative) onto the surface. Then, the catalytic responses in the presence of Cys have been studied.

Objectivos

O principal objectivo dos estudos realizados foi o de aprofundar a compreensão dos processos complexantes de metais quando em presença de ligandos de S e Se, por exemplo, as fitoquelatinas (PC_n), que estão na base da fitorremediação, sendo capazes de complexar metais pesados que entram na célula de várias plantas, algas ou fungos.

Numa primeira fase, o trabalho centra-se sobre a utilidade da voltametria de impulsos diferenciais (DPV) com aplicação do método quimiométrico de resolução multivariada de curvas com mínimos quadrados alternados (MCR-ALS) para resolver sistemas de misturas de peptídeos (fitoquelatinas e seus fragmentos), na presença de Cd^{2+}. Os resultados obtidos são comparados com a espectrometria de massa (ESI-MS), para confirmação da estequiometria dos complexos formados.

Em segundo lugar foi estudada a fitoquelatina PC_5, com elevada capacidade complexante, na presença dos iões metálicos Cd^{2+} e Pb^{2+}. O maior tamanho do péptido, cadeia mais longa, em relação a outras PC_n anteriormente estudadas implica *a priori* modelos de complexação mais elaborados. Portanto, fez-se um estudo sistemático por técnicas de natureza totalmente diferente, mas que fornecem informações adicionais para um quadro completo da complexação. A metodologia proposta, com base em uma combinação de análise quimiométrica (usando MCR-ALS e novos algoritmos pHfit e GPA) de medidas por DPP e dicroísmo circular (CD), complementados por ESI-MS permite a obtenção de informações mais precisas sobre este sitema, devido ao contraste de técnicas experimentais tão diversas.

O terceiro objectivo foi o de estudar a selenocistina (SeCyst), em várias situações de complexação competitiva. O comportamento electroquímico de SeCyst sozinha ou na presença de um ião metálico (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} e Zn^{2+}) foi estudado por DPP num intervalo de pH alargado. Estas observações foram comparados com os dados de titulação calorimétrica isotérmica (ITC) a pH fisiológico (7.4) que permite a obtenção dos parâmetros de constantes termodinâmicas e de complexação. Foi ainda estudado o comportamento da SeCyst no sistema multiplo de iões metálicos, seleccionando o ião cádmio como modulador de um metal não é essencial, enquanto que, Zn^{2+} foi escolhido para o caso de um elemento essencial. Além disso, estudaram-se ainda misturas de SeCyst e glutatião (GSH), na presença de Cd^{2+} a pH fisiológico.

Um último objectivo foi avaliar a potencial utilização de eléctrodos modificados para a detecção de tióis. Na estadia realizada na Universidade de Oxford, procedeu-se a estudos de dois tipos de eléctrodos de carbono modificados: o carbono vítreo (GCE) e grafite (EPPG), imobilizanddo nas suas superfícies um centro de redox metalálico (derivados do ferroceno, Fc). Estes eléctrodos modificados Fc foram estudados em solução aquosa e diversos meios orgânicos. Finalmente, foi estudada a sua resposta catalítica na presença de Cys.

Estructura y contenidos

La idea central de esta Tesis doctoral es el estudio mediante diversas técnicas de la complejación competitiva entre iones metálicos y ligandos de S y Se. La Tesis está estructurada en cuatro conjuntos de capítulos que son la Introducción (I), Experimental (II) y Resultados y Discusión (III) y Conclusiones (IV), con estructura análoga a la de una publicación en las revistas científicas. En la primera parte de la memoria se proporciona una revisión bibliográfica que encuadra los asuntos abordados a lo largo de la Tesis. En el Capítulo 1 se expone la importancia del análisis de los metales pesados, su toxicidad y bioacumulación, centrandose en aquellos que son objeto de estudio en esta Tesis. En el Capítulo 2 se detallan algunas de las propiedades de los ligandos que, en la mayoría de los casos son moléculas de interés ambiental o biológico y que contienen azufre o selenio. En el Capítulo 3 se explican los fundamentos de cada una de las técnicas utilizadas en los diferentes estudios, con especial enfoque en las técnicas electroanalíticas y los métodos quimiométricos empleados al conjunto de datos.

En la segunda parte de la memoria (II. Experimental) se repasan la instrumentación, reactivos y procedimientos experimentales.

En la tercera parte (III. Resultados) se exponen y discuten los resultados obtenidos que están organizados en cuatro capítulos. El Capítulo 6 contiene tres artículos:

- *Competitive binding of Cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by Multivariate Curve Resolution*
  Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.
  Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394(4), 1137 - 1145 (2009).

Este artículo introduce el estudio de complejación competitiva de dos ligandos con un grupo tiol en presencia del Cd^{2+}. Los complejos propuestos a través del análisis DPP/MCR-ALS están confirmados completamente por ESI-MS y destacan la preferencia del Cd^{2+} en formar complejos con ligandos de cadena mas larga.

- *Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry*
  Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.
  The Analyst, 135(1), 86 - 95 (2010).

En este artículo a partir de los conocimientos sobre los procesos individuales de los dos metales con cada uno de los ligandos adquiridos en el artículo anterior, se lleva a cabo un estudio de competitividad para la mezcla de dos ligandos. El principal interés fue seguir el desplazamiento en los procesos de competición del Cd^{2+} por los ligandos. La estequiometria de los complejos formados se confirmó por ESI-MS.

- *Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium*.
  Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.
  Analytical Biochemistry, 406(1), 61 - 69 (2010).

Teniendo en cuenta los resultados anteriores, este trabajo implicó una investigación más exhaustiva de la influencia de la longitud de la cadena y número de grupos tioles de las PC_n en el enlace con el ión metálico y en la competición entre ligandos. La metodología DPP/MCR–ALS se aplicó al análisis del desplazamiento del Cd^{2+} complejado con GSH (que es de hecho la PC_1) por diferentes PC_n (n=2-5) de creciente longitud de cadena.

El objetivo de la siguiente etapa de la Tesis se encuentra en la misma línea que la anterior, eligiendo una fitoquelatina con elevado numero de grupos tioles, la PC_5, se estudió la complejación competitva en presencia de dos de los metales pesados más tóxicos, el Cd y el Pb. . Los principales resultados se presentan en el artículo del Capítulo 9:

- Circular Dichroism and Voltammetry, assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC_5.
  Gusmão, R.; Cavanillas, S.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.
  Analytical Chemistry , 82(21), 9006 - 9013 (2010).

Este artículo presenta el estudio de complejación de dos metales con la PC_5 por separado, así como un estudio de competitividad para la mezcla de los dos metales. Se introduce en esta Tesis el uso del Dicroísmo Circular (CD). Los complejos propuestos a través del análisis DPP/MCR-ALS se confirman completamente por ESI-MS.

El Capítulo 9 engloba dos trabajos que tienen por finalidad estudiar la complejación entre varios metales y la selenocistina (SeCyst), utilizando algunas de las técnicas analíticas ya usadas en trabajos anteriores e introduciendo el uso de las valoraciones calorimétricas (ITC) como técnica complementaria para obtener los parámetros termodinámicos de los sistemas estudiados:

- Chemometric analysis of voltammetric data on metal ion binding by selenocystine.
  Gusmão, R.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M.
  Journal of Physical Chemistry A, 116(25), 6526 - 6531 (2012).

En el primer artículo se estudia el comportamiento electroquímico de la señal del ligando SeCyst, solo y en presencia de un catión metálico, en un amplio intervalo de pH. Para ello se han seleccionado, además de los cationes “clásicos” estudiados en anteriores trabajos del grupo (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}), otros considerados de interés biológico (Bi^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} y Ni^{2+}).

- Combination of chemometrically assisted voltammetry, calorimetry, and circular dichroism as a new method for the study of bioinorganic substances: application to selenocystine metal complexes.
  Gusmão, R.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M.
  Journal of Biological Inorganic Chemistry, 17(2), 321 - 329 (2012).

En el seguimiento del trabajo anterior, en un primer apartado se ha descrito el estudio de la complejación de la SeCyst con los metales mediante valoración isotérmica calorimétrica (ITC). Con las valoraciones por ITC se intentó obtener información cinética y termodinámica de los complejos de la SeCyst y una confirmación de los datos obtenidos en el trabajo anterior. A continuación, se han considerado dos situaciones típicas de complejación competitiva. En la primera situación se ha analizado, mediante técnicas utilizadas previamente en esta Tesis, la competencia entre Cd^{2+} y Zn^{2+}. Finalmente, y con el propósito de aportar nuevos datos a la interacción de Se y S, en el presente capítulo analizamos un último ejemplo de gran interés, como es la complejación de mezclas de ligandos en que están presentes calcógenos diferentes (O, S y Se).

En el último Capítulo 10, se presentan los estudios realizados en el Departamento de Química de la Universidad de Oxford (Reino Unido), en el grupo dirigido por el Prof. Richard Compton. La estancia en Oxford se ha planificado con la finalidad de mejorar y profundizar los conocimientos de aplicaciones de técnicas electroquímicas. Se evaluó la posible utilización de electrodos modificados para la detección de tioles. Se llevaron a cabo estudios de modificación de dos tipos de electrodos de carbono: el de carbono vitrificado (GCE) y el de grafito pirolítico "*edge plane pyrolytic graphite*" (EPPG), inmovilizando en sus superficies un centro metálico redox (derivados del Ferroceno, Fc). Finalmente, se estudió su respuesta catalítica en presencia de Cys.

- Marcus-Hush-Chidsey theory of electron transfer to and from species bound at a non-uniform electrode surface: Theory and experiment
  Henstridge, M.C.; Batchelor-McAuley, C.; Gusmao, R.; Compton, R.G.
  Chemical Physics Letters, 517, 108-112, (2011).

Acrónimos

Atomic Absorption Spectroscopy	**AAS**	Espectroscopía de Absorción Atómica
Alternating Current Polarography	**ACP**	Polarografía de Corriente Alterna
Alternating Least Squares	**ALS**	Mínimos Cuadrados Alternados
Atmospheric Pressure Chemical Ionisation	**APCI**	Ionización Química a Presión Atmosférica
Anodic Stripping Voltammetry	**ASV**	Voltamperometría de Redisolución Anódica
Au Rotating Disk Electrode	**AuRDE**	Electrodo de Disco Rotatorio de Au
Bi Film Electrode	**BiFE**	Electrodo de Película de Bi
Basal Plane Pyrolytic Graphite	**BPPD**	Grafito Pirolítico de Plano Basal
Circular Dichroism	**CD**	Dicroísmo Circular
Chemical Ionization	**CI**	Ionización Química
Carbon Nanotubes	**CNT**	Nanotubos de Carbono
Cathodic Stripping Voltammetry	**CSV**	Voltamperometría de Redisolución Catódica
Cyclic Voltammetry	**CV**	Voltamperometría Cíclica
Dropping Mercury Electrode	**DME**	Electrodo de Gotas de Mercurio
Differential Pulse Cathodic Stripping Voltammetry	**DPCSV**	Voltamperometria de Redisolución Catódica Diferencial de Impulsos
Differential Pulse Polarography	**DPP**	Polarografía Diferencial de Impulsos
Differential Pulse Voltammetry	**DPV**	Voltamperometría Diferencial de Impulsos
Differential Scanning Calorimetry	**DSC**	Calorimetría Diferencial de Barrido
Evolving Factor Analysis	**EFA**	Análisis de Factores Emergentes
Electron Impact	**EI**	Ionización Electrónica

Electrochemical Impedance Spectroscopy	**EIS**	Espectroscopia de Impedancia Electroquímica
Edge Plane Pyrolitic Graphite	**EPPG**	Grafito Pirolítico de Plano Límite
Electrospray Ionization Mass Spectrometry	**ESI-MS**	Espectrometría de Masas por Ionización de Electrospray
Extended X-ray Absorption Fine Structure	**EXAFS**	Espectroscopia de Absorción de Rayos X de Estructura Fina
Fast Atom Bombardment	**FAB**	Bombardeo con Átomos Rápidos
Film Mercury Electrode	**FME**	Electrodo de Película de Mercurio
Glassy Carbon Electrode	**GCE**	Electrodo de Carbono Vitrificado
Gaussian Peak Adjustment	**GPA**	Ajuste Mediante Picos Gaussianos
Hanging Mercury Drop Electrode	**HMDE**	Electrodo de Gota Colgante de Mercurio
Highly Ordered Pyrolytic Graphite	**HOPG**	Grafito Pirolítico Altamente Ordenado
High Performance Liquid Chromatography	**HPLC**	Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución
Isothermal Titration Calorimetry	**ITC**	Valoración Isotérmica Calorimétrica
Lack of Fit	**lof**	Falta de Ajuste
Matrix Assisted Laser Desorption Ionization	**MALDI**	Desorción/Ionización Láser Asistida por Matriz
Microelectrodes	**MEA**	Microelectrodos
Multivariate Curve Resolution	**MCR**	Resolución Multivariante de Curvas
Multi Walled Carbon Nanotubes	**MWCNT**	Nanotubos de Carbono de Pared Múltiple
Nuclear Magnetic Resonance	**NMR**	Resonancia Magnética Nuclear
Normal Pulse Polarography	**NPP**	Polarografía de Impulsos Normal
Principal Component Analysis	**PCA**	Análisis de Componentes Principales
Principal Component Regression	**PCR**	Regresión por Componentes Principales

Partial Least Squares	**PLS**	Mínimos Cuadrados Parciales
Reverse Pulse Polarography	**RPP**	Polarografía de Impulsos Inversa
Self-Assembled Monolayers	**SAM**	Monocapas Autoensambladas
Stripping Chronopotentiometry	**SCP**	Cronopotenciometría de redisolución
Static Mercury Drop Electrode	**SMDE**	Electrodo de Gotas de Mercurio Estáticas
Screen Printed Electrodes	**SPE**	Electrodos Serigrafiados
Singular Value Decomposition	**SVD**	Descomposición en valores Singulares
Single Walled Carbon Nanotubes	**SWCNT**	Nanotubos de Carbono de Pared Simple
Time-of-Flight	**TOF**	Tiempo de Vuelo
Thermospray Ionization	**TSP**	Ionización por Termonebulización
Ultraviolet/Visible Spectroscopy	**UV/Vis**	Espectroscopia Ultravioleta/Visible

Sustancias

Bis-(2- hydroxymethyl)-aminomethane	**Bis**	Bis-(2-hidroximetil)-aminometano
Valeronitrile	**BuCN**	Valeronitrilo
Cysteine	**Cys**	Cisteína
Cystine	**Cyst**	Cistina
Dimethyl Selenide	**DMDSe**	Dimetildiselenio
Dimethyl Selenium	**DMSe**	Dimetilselenio
Ethylenediaminetetraacetic Acid	**EDTA**	Ácido etilendiaminotetraacético
Ferrocene	**Fc**	Ferroceno
Glutamic Acid	**Glu**	Ácido Glutámico
Glycine	**Gly**	Glicina
Glutathione Peroxidase	**GPx**	Glutatión Peroxidasa
Glutathione	**GSH**	Glutatión
Oxidized Glutathione	**GSSG**	Glutatión oxidado
Homocysteine	**HCys**	Homocisteína
Acetonitrile	**MeCN**	Acetonitrilo
Methionine	**Met**	Metionina
Metallothionein	**MT**	Metalotioneína
Phytochelatin	**PC**	Fitoquelatina
Phytochelatin Synthase	**PCS**	Fitoquelatín Sintasa
Butyronitrile	**PrCN**	Butironitrilo
Selenocysteine	**SeCys**	Selenocisteína
Selenocystine	**SeCyst**	Selenocistina
Selenomethionine	**SeMet**	Selenometionina
Tetra- butylammonium Perchlorate	**TBAP**	Perclorato de Tetra-butilamonia
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethane	**Tris**	Tris-(hidroximetil)-aminometano

Agradecimientos

Esta es una historia que tiene un prólogo que no viene incluida en la memoria. Se inició en 2006 en mi etapa de estudiante, cuando el Prof. Miquel Esteban me acepta en su grupo como estudiante *Erasmus*. En ese momento tuve el privilegio de trabajar directamente con Anna Garrigosa y aprender mucho del trabajo de laboratorio. También tuve el placer de conocer a Elena Chekmeneva. Ambas me han hecho aumentar el grado de exigencia de mi trabajo.

Agradezco a mis directores de tesis, Prof. Miquel y Dr. José Manuel, que a lo largo de los años me han privilegiado con su experiencia, el intercambio de conocimiento y la amistad. Gracias por haberme acogido en el grupo de Investigación, por el trabajo de edición y revisión en las publicaciones científicas, así como en la Tesis.

Dra. Cristina, de la cual no me he olvidado, estuvo en Lisboa, formando parte del tribunal que juzgó mi trabajo realizado como estudiante *Erasmus,* y me animó a volver a Barcelona para hacer la tesis. A través de los años, sus consejos y colaboración en el trabajo y escritura de las publicaciones han resultado muy valiosos.

Además de las personas ya mencionadas, quiero dar las gracias a TODOS los compañeros con los que he trabajado, compartiendo laboratorio, y que tanto me han apoyado en todo. En particular, gracias a las personas con quienes tuve la suerte en ser co-autor de publicaciones: Dra. Núria Serrano, Dra. Elena Chekmeneva, Dr. Rafael Prohens (Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria), Santiago Cavanillas y Claudia Gilsanz.

Gracias a Laura Ortiz y a la Dra. Irene Vidal, responsables de que los equipos de masas de los Serveis Cientificotècnics, que tanto apoyo prestaron en los experimentos de ESI-MS.

I wish to acknowledge Prof. Richard Compton and his entire research group with whom I had the great privilege of working with at the Physical and Theoretical Chemistry Laboratory, University of Oxford, England. I always left Richard's office with the enthusiasm of an undergrad that had just had a master class. Thanks to all I shared the workspace Dr. Eduardo Laborda, Dr. Niel Rees, Dr. Juan Petersen, Chris Batchelor, Martin Henstridge, Yige Zhou and Danu Suwatchara.

Uma breve palavra de amizade para com quem partilhei o meu dia-a-dia em Barcelona, em especial o Alexandre Oliveira, Věra Opatová, Pedro Oliveira, Wannes Debusschere, Tom Florin, Charles Webb e Filipa Quintela.

Um muito obrigado a toda a minha família, nos quais incluo os que já não estão entre nós. Agradeço também à minha nova família, os Dias e os Machado: Angela, Nuno, Guilherme, Cecilia e Fátima.

Um grande abraço para os meus pais, Rui Manuel Gusmão e Filomena Coelho, bem como à minha mana, Helena e ao seu Joel. Em breves palavras agradecer-vos o amor, cuidados, visitas, o incondicional apoio moral e emocional.

Quanto a ti, Marta, a nossa história já vem de antes da escrita da tese e sem dúvida que vai continuar por muito muito muito mais tempo. A ti desejo agredecer por todo o apoio, compreensão e amor não só ao longo da elaboração da tese, mas pela coragem emocional e persistência dos afectos, mesmo que muitas vezes à distância ao longo dos anos. Sem ti não seria possivel chegar ao fim disto. Sem ti não poderia seguir em frente.

Esta tesis Doctoral se ha realizado con la ayuda financiera otorgada por el Ministerio de Educación, Cultura y Deporte (MECD) mediante una beca predoctoral para el periodo septiembre 2007 a septiembre 2011 (FPI BES-2007-15385). La estancia en la *University of Oxford* se realizó con la ayuda financiera del subprograma de estancias breves (EEBB-2011-44249).

Así mismo se contó con el suporte económico proporcionado por el MECD mediante los proyectos CTQ2006-14385-CO2-01 y CTQ2009-09471.

Parte I

Introducción

Capítulo 1

Los metales en el medio ambiente

1.1 Importancia del análisis de los metales pesados

En los sistemas acuáticos se disuelven numerosas sales y otras sustancias [1]. La presencia en el terreno de diferentes materiales y estructuras geológicas son fuente de una gran variedad de iones disueltos en aguas superficiales. Esta información permitiría saber, de no haber existido la actividad humana, qué tipo de suelo atraviesa un cauce de agua. Algunos de estos iones se encuentran en forma mayoritaria, mientras que otros se hallan a niveles de trazas, como es el caso de los metales pesados, siendo algunos de ellos necesarios para el correcto desarrollo de los microorganismos, plantas y animales [2].

La contaminación en los ríos y suelos se produce, bien por la presencia de compuestos o elementos que normalmente no estarían sin la acción del hombre, o por un aumento o descenso de la concentración normal de las sustancias ya existentes debido a la acción humana [3]. Un grupo de elementos químicos potencialmente muy tóxicos son los metales pesados, y metales relacionados, y entre ellos Sb, As, Cd, Cu, Cr, Hg, Ni, Pb, Se, Zn. El aporte de estos metales al ciclo hidrológico procede de diversas fuentes, siendo una de ellas de origen geoquímico a partir de los minerales que por la erosión, las lluvias, etc. son arrastrados al agua. No obstante, actualmente la mayor concentración es de origen antropogénico (debida a la actividad humana). La minería, los procesos industriales, los residuos domésticos son fuentes importantes de contaminación que aportan metales al aire, al agua y al suelo [4].

1.2 Toxicidad y bioacumulación de los metales pesados

Las evidencias experimentales demuestran que el grado de importancia biológica de los iones metálicos pesados (algunos de los cuales son oligoelementos) con respecto a los sistemas vivos siguen el mismo patrón que su disponibilidad en la naturaleza [5]. Además, existe una aparente correlación entre la abundancia de los elementos en la corteza terrestre y las necesidades alimentarias de las células microbianas [6]. Estos metales, en cantidades mínimas o traza, pueden ejercer efectos positivos o negativos sobre los seres vivos. Algunos de ellos, en determinadas concentraciones, siempre menores al 0.01% de la masa total del organismo, son elementos esenciales para la vida. Es el caso de V, Cr, Mo, Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn para el hombre [7]. No obstante, pequeñas variaciones de sus concentraciones, tanto disminuciones como incrementos, pueden producir efectos nocivos, a veces graves, crónicos e incluso letales sobre los seres vivos. Iguales efectos nocivos pueden ser causados por otros metales traza no esenciales que, de forma natural o principalmente como consecuencia de la actividad humana, se encuentren accesibles en el medio ambiente.

El grado de toxicidad potencial y la biodisponibilidad que un metal pesado presenta en un ambiente dado depende de una serie de factores, que si bien están muy interrelacionados, se pueden clasificar en dos grupos: factores abióticos y factores bióticos.

1.2.1 Factores abióticos

Para clarificar la exposición vamos a dividir a su vez los factores abióticos en dos subgrupos:

1.2.1.1 Factores inherentes al metal, entre los que se encuentran la naturaleza del metal, su abundancia de disponibilidad en el medio, su estado molecular específico y su tiempo de permanencia en el sistema.

1.2.1.2 Factores físico-químicos ambientales, principalmente el pH, potencial redox, presencia de iones inorgánicos (tanto aniones, como cationes), existencia de minerales de arcilla e hidróxidos metálicos, cantidad de materia orgánica, temperatura, contenido de oxígeno, etc. Todos los factores inherentes al metal son modificables por factores físico-químicos [8].

1.2.1.1 Factores inherentes al metal

La toxicidad depende en primer lugar de la propia naturaleza del metal y de su disponibilidad en el ambiente. Atendiendo a estos dos factores, se pueden clasificar los metales conjuntamente con otros elementos, en tres categorías [9]:

- No críticos: Na, K, Mg, Ca, H, N, C, P, Fe, S, Cl, Br, F, Li, Rb, Sr, Si, Mn y Al;.
- Tóxicos pero muy insolubles: Ti, Hf, Zr, W, Nb, Ta, Re, Ga, Os, Rh, Ir, Ru y Ba;
- Muy tóxicos y relativamente disponibles: Be, Co, Ni, Cu, Zn, Sn, Cr, As, Se, Te, Pd, Ag, Cd, Pt, Au, Hg, Tl, Pb, Sb y Bi.

Un tercer factor a tener en cuenta es el estado molecular que presente el metal. Al estar sometidos a diferentes condiciones ambientales, los metales pesados pueden mostrar diversas configuraciones moleculares. Sus diferentes especies moleculares o especies químicas pueden suponer distintos grados de bioasimilación o toxicidad [10,11].

También influye sobre la toxicidad del metal el tiempo de residencia en el sistema (dato de muy difícil determinación), que puede llegar a ser de muchos años si las condiciones y la estabilidad del medio acuático así lo permiten [12].

1.2.1.2 Factores físico-químicos ambientales

Su efecto combinado tiene gran influencia sobre el grado de toxicidad y sobre la incorporación de los metales pesados por la biota acuática [13]. Se describe a continuación la influencia de algunos parámetros. El pH afecta a la especiación química y a la movilidad de muchos metales pesados [9]. Este factor juega un papel importante en las interacciones de los metales pesados con los compuestos que afectan a la dureza del agua (carbonatos) y con los compuestos orgánicos [13]. Así, por ejemplo, al aumentar progresivamente la concentración de iones hidroxilo, el Cd^{2+} forma secuencialmente diferentes especies hidroxiladas:

Cd^{2+}; $CdOH^{+}$; $Cd(OH)_2$; $Cd(OH)_3^{-}$; $Cd(OH)_4^{2-}$

Los demás metales pesados se comportan de forma similar. Las distintas especies químicas, de un mismo metal, que se presentan según las condiciones de pH, pueden tener diferente toxicidad [14]. Los cambios de pH pueden influir fuertemente en la adsorción o liberación de cationes (desorción) por las sustancias orgánicas. Los aminoácidos, que aparecen en elevadas concentraciones tanto en solución como precipitados en sedimentos de aguas eutróficas o contaminadas, pueden adsorber o liberar cationes metálicos, debido a su carácter anfótero [13].

El potencial redox de un ambiente dado influye sobre los fenómenos de especiación metálica. Los equilibrios redox están controlados por la actividad de los electrones libres en el agua, que a su vez vienen definidos por el potencial redox (E_h). A altos valores de E_h se asocian fenómenos oxidantes, mientras que a bajos valores del mismo lo hacen los reductores. Los sedimentos están sometidos a unas condiciones redox determinadas, que pueden afectar al estado de algunos elementos tales como C, Ni, O, S, Fe. Ag, As, Cr, Hg y Pb. Cuando los sulfatos se reducen a sulfuros la tendencia es producir la precipitación de los metales (FeS_2, HgS, CdS, CuS, MnS y ZnS). El potencial redox puede influir en los procesos de adsorción, incluso al propio contaminante [14].

Los iones inorgánicos presentes en las aguas, tanto aniones como cationes, tienen una gran influencia sobre la toxicidad de los metales pesados, debido a la formación de compuestos insolubles como carbonatos o a la adsorción sobre carbonato cálcico [15]. Esto sucede especialmente cuando se produce la mezcla de aguas de diferentes orígenes, como son los vertidos industriales y domésticos en los cursos fluviales naturales o las aguas superficiales de distintas características fisico-químicas [16].

La temperatura influye sobre la solubilidad de los metales y, al igual que el contenido de oxigeno disuelto, afecta de forma decisiva tanto a la distribución como al estado fisiológico de la biota del sistema acuático del que va a depender la respuesta frente al tóxico.

La materia orgánica, tanto soluble como particulada, altera la distribución de los metales pesados; se produce por regla general una disminución de los niveles disueltos y un aumento de la concentración de metales en la forma coloidal y en suspensión así como en los sedimentos. Los exudados orgánicos de ciertos organismos, los quelantes naturales, como succinato, citrato y aspartato, los aminoácidos con grupos sulfhidrilo (-SH) presente en el medio, los quelantes orgánicos de síntesis (EDTA, NTA) y los ácidos húmicos y fúlvicos son algunas de las sustancias orgánicas capaces de retener metales, aunque sea de forma temporal [17].

Mención especial requieren las sustancias humicas y fulvicas, por su alta capacidad de interacción con los iones metálicos, óxidos metálicos, hidróxidos metálicos y otras sustancias orgánicas y minerales para formar complejos solubles o insolubles en agua, de muy diferente naturaleza fisico-química y variable estabilidad.

La formación de sustancias solubles es mayoritaria para los ácidos fúlvicos, debido a su bajo peso molecular; dependiendo del número de grupos activos enlazados al catión metálico, el complejo puede denominarse tipo sal o tipo quelato, igualmente dependiendo de la unión directa del metal al grupo activo o de la indirecta a través de un puente de agua. Se sabe que la adsorción tiene una eficacia variable, lo que equivale a admitir diferentes mecanismos de adsorción, pero en cualquier caso, esa eficacia es mayor cuanto mayor es el contenido de ácidos húmicos, más alto el pH y más baja la concentración del metal.

Los metales polivalentes estan fuertemente complejados con las sustancias húmicas. El contenido y calidad de la materia orgánica está correlacionado con la capacidad de enlace de los metales; los elementos traza pueden formar complejos con ligandos orgánicos e inorgánicos. Entre los factores que afectan su estabilidad cabe citar la valencia del componente iónico, el grado de valencia, su coordinación, polaridad y los efectos de campo ligando. Generalmente la estabilidad del complejo aumenta con la valencia del catión y disminuye con el radio iónico [18].

1.2.2 Factores bióticos

El comportamiento de los metales no depende solo de parámetros fisico-químicos, sino que se ve afectado por factores biológicos que intervienen en la solubilización e insolubilización de elementos inorgánicos, alteración de minerales y formación de depósitos [19]. La toxicidad de los metales pesados en los sistemas acuáticos está condicionada de forma importante a su vez por [20]:

a) El grado de bioasimilación y los mecanismos de defensa que esgriman los organismos frente a los metales.

b) La acción que la propia biota pueda ejercer sobre su especiación química.

La especiación de un metal puede deberse a la acción ejercida por determinados organismos sobre los metales. La actividad metabólica de los microorganismos juega un papel importante en la movilidad de los elementos tóxicos en el medio ambiente [9]. Debido a la acción de algunas cepas bacterianas (mecanismos de detoxificación) o a la de algunos organismos bentónicos detritívoros, pueden aparecer en el medio especies metálicas más o menos móviles, tóxicas y bioasimilables para la biota de niveles tróficos superiores que las pre-existentes [16].

La insolubilización y acumulación de metales pesados puede asociarse con la biodegradación de los ligandos orgánicos que forman los complejos organo metálicos solubles. El metal puede ser precipitado como hidróxido y/o adsorbido por los microorganismos que, en función de su tamaño y composición de sus paredes celulares, actúan como moléculas orgánicas activas.

1.3 Metales pesados objeto de estudio

En la presente Tesis se han estudiado los siguientes metales pesados: cadmio, cobre, cromo, cobalto, mercurio, níquel, plomo y zinc. A continuación se describen las principales características fisico-químicas de los elementos que se han estudiado más detalladamente.

1.3.1 Cadmio

El cadmio no aparece en el medio ambiente en su forma pura, y asimismo no existen minerales que contengan cadmio en su composición en cantidades suficientes para ser aprovechables comercialmente, obteniéndose siempre como producto secundario de extracción de otros elementos. Casi todos los depósitos de zinc contienen cadmio, a pesar de que la concentración de éste último no sobrepasa el 1%. El cadmio está asociado al zinc en forma de sulfuro, y la solubilidad de sus compuestos en el agua depende fundamentalmente de la acidez de ésta, siendo sus complejos húmicos poco solubles. El cadmio existe en disolución en varias formas, sobre todo como ion libre Cd^{2+} [18].

El cadmio es un metal muy tóxico, pero actualmente se le considera importante y con múltiples aplicaciones [20]. Las principales fuentes antropogénicas son, por orden decreciente, las siguientes [21]:

- Emisiones al aire de incineradoras, al quemar los combustibles fósiles, fundiciones metálicas (Zn, Pb, Cu) e industrias relacionadas con la manufactura de aleaciones, pinturas resistentes a la corrosión, baterías y estabilización de plásticos.
- Utilización en la agricultura de lodos, fertilizantes fosfatados y pesticidas que contengan cadmio.
- La combustión de carburantes fósiles.

La forma más común del cadmio es el sulfuro (CdS). Durante la erosión penetra en el medio ambiente sobre todo en forma soluble, Cd^{2+}. El pH y el potencial redox son los principales factores que controlan su movilidad. También forma hidróxidos ($CdOH^{+}$; $Cd(OH)_3^{-}$ y $Cd(OH)_4^{2-}$), cloruros ($CdCl^{+}$; $CdCl_3^{-}$; $CdCl_4^{2-}$) e iones complejos con grupos amonio y cianuro, y variedad de complejos estables con la materia húmica y con ligandos sintéticos, como EDTA y NTA. Sus iones forman compuestos insolubles de color blanco, normalmente hidratados, con carbonatos, arseniatos, fosfatos, oxalatos y ferrocianuros [22]. Está asociado principalmente con minerales de Zn, Pb-Zn y Pb-Cu-Zn; su concentración depende normalmente del contenido de Zn [22].

En la industria se utiliza principalmente en los procesos de galvanizado junto con otros metales o aleaciones, como protector contra la corrosión, en la manufactura de pigmentos de las series de amarillo a naranja (sulfuros de cadmio) y, de rosa a rojo y marrón (sulfoseleniuros de cadmio), en la fabricación de pinturas y colorantes para el caucho, estabilizador de plásticos de PVC, tintes de imprenta, cuero, vidrio, esmaltes vitrificables, papeles pintados, etc. Como cadmio metálico se usa para soldaduras Cd-Ag y Mn-Cd, en cables de teléfono y tranvías (1% Cd y el resto Cu) y en laminas o chapas para radiadores de automóviles, y en baterías de Ni-Cd [23].

Se aprovecha además en fotografía y litografía, como catalizador en síntesis orgánica, en el laboratorio de análisis químico, etc. Sus carbonatos, sulfuros e hidróxidos tienen solubilidades muy bajas y es probablemente por ello que la mayor parte de Cd de los ambientes acuáticos aparece en los sedimentos [22].

1.3.2 Mercurio

La corteza terrestre contiene aproximadamente 50 ng g^{-1} de Hg, principalmente como sulfuro. El mercurio se halla en todo tipo de rocas (ígneas, sedimentarias y metamórficas). El contenido de mercurio en muchas rocas ígneas generalmente es <200 ng/g, con una concentración media inferior a 100 ng g^{-1}. Muchas rocas sedimentarias tienen contenidos de Hg por debajo de 200 ng g^{-1}, excepto para esquistos que son mucho más elevados. Los esquistos con altos porcentajes en materia orgánica están particularmente enriquecidos por el mercurio.

El mercurio habitualmente no se encuentra en el medio natural y su presencia significa una contaminación de carácter antropogénico [24]. Este metal es considerado como el más tóxico de todos los metales pesados que aquí se tratan. El origen principal del mercurio es el uso de pesticidas mercuriales, la amalgamación del oro, las industrias químicas, la minería e industrias en general [25, 26].

El mercurio, dada su volatilidad puede encontrarse en las tres fases: atmósfera, medio acuoso y sedimentos. En los medios aeróbicos de los reservorios, el mercurio se encuentra en la forma iónica libre, Hg2+, formando compuestos orgánicos, así como en complejos con OH^-: $HgOH^+$, y con el Cl^-: $HgCl^+$, $HgCl_2$, $HgCl_3$. El ion Hg^{2+} tiene una elevada tendencia de adsorberse sobre partículas sólidas, de tal manera que el material en suspensión puede llegar a tener un contenido en Hg^{2+} unas 25 veces mayor que en solución y, en las algas y otras plantas acuáticas, hasta 104 veces a lo que existe en el agua. Además del ion Hg^{2+}, el mercurio puede encontrarse en forma mercuriosa (Hg_2^{2+}) o metálica, Hg. En realidad, en el medio acuático existen determinadas bacterias capaces de reducir el Hg^{2+} a Hg, el cual escapa a la atmósfera o bien sedimenta una vez adsorbido sobre partículas sólidas. En las zonas anóxicas del reservorio y bajo la presencia de iones S^{2-}, se forman complejos con el ion Hg^{2+}, e incluso puede llegar a precipitar como HgS [27].

1.3.3 Plomo

El plomo es un elemento frecuente en la litosfera, puede encontrarse en forma de sulfuro de plomo PbS (galena), carbonato de plomo $PbCO_3$ (cerusita) y sulfato de plomo $PbSO_4$ (anglesita). Los minerales de silicatos, feldespatos y magnetitas son notables sumideros de plomo en los sedimentos [28]. El plomo es un metal muy poco móvil y que tiende a adsorberse en la zona no saturada de los ríos, por el material arcilloso y la materia orgánica, y con el aumento del pH puede precipitar como $Pb(OH)_2$ [28]. En el medio acuático a un pH comprendido entre 7 y 9, el plomo se encuentra como ion libre divalente, Pb^{2+}, así como también como carbonato disuelto $PbCO_3$. En presencia de sulfatos, también se forma la sal poco soluble $PbSO_4$. Con el ion OH^- forma complejos estables, principalmente $PbOH^+$.

El principal factor limitante de la presencia de plomo en las aguas, es la formación de hidróxido y carbonato insoluble. En el intervalo de pH entre 5 y 7, la mayor vía de eliminación es por adsorción sobre las partículas arcillosas [28]. El plomo puede presentarse bajo diferentes formas químicas: Pb(0) metal, Pb(I), Pb(II) y Pb(IV) todas ellas, con la probable excepción del Pb(I), tienen importancia en el medio ambiente [28].

El plomo proviene de la fabricación de acumuladores eléctricos, baterías, pigmentos, explosivos, reactivos químicos, compuestos para soldadura, y pinturas (por su resistencia a

la corrosión y a la acción de los ácidos, especialmente al ácido sulfúrico) [28]. Otras fuentes importantes de emisión de plomo a la atmósfera son las fundiciones de plomo, las actividades de recuperación del metal y la combustión de combustibles fósiles de donde es transportado por la atmósfera y se deposita en los cursos de las aguas continentales [28]. En áreas urbanas, hasta su prohibición en las gasolinas, el plomo era emitido por vehículos y depositado en las calles y por lavados por la lluvia [29].

1.3.4 Zinc

El zinc es un metal muy abundante en la corteza terrestre. En aguas superficiales se encuentra en forma inorgánica, iónica o coloidal, siendo las especies más frecuentes Zn^{2+}, $Zn(OH)^{+}$ y $ZnCl_3^{-}$. Sus compuestos poco solubles (hidróxidos y carbonatos) tienen capacidad de adsorberse fuertemente sobre sedimentos y lodos en el fondo del lecho de los cauces hídricos [30]. Este elemento puede presentar niveles significativos en el medio acuático debido a las deyecciones de animales y personas [30].

Según estudios realizados se ha demostrado que una persona adulta excreta entre 7 y 20 mg L^{-1} de zinc al día [31]. La forma química bajo la que aparece en el medio ambiente es Zn(II), también puede darse el Zn(0), el Zn(I) [32].

El zinc metálico y/o sus sales son principalmente utilizados en los siguientes procesos industriales: recubrimientos protectores de numerosos metales contra la corrosión y en la galvanización (por ejemplo en tuberías usadas comúnmente en sistemas de abastecimiento de agua, cuya corrosión contribuye, debido a la solubilización del Zn, a las concentraciones de este metal encontradas en aguas residuales y potables), aleaciones como el latón y el bronce, papel, cristales, porcelanas, cerámica y esmaltes, fabricación y vulcanización del caucho, industria textil (seda artificial, tintes, mordientes, impermeabilizantes), pinturas, cerámica, etc.), laboratorios químicos y farmacéuticos (fabricación de insulinas al Zn), conservantes de la madera, y otros.

También tienen aplicaciones en la agricultura como insecticida (ferrosulfonato de Zn), como componente de los superfosfatos y como raticida (Zn_3P_2) [33]. Es importante resaltar que el zinc es un elemento esencial para el hombre, sin ser tóxico a dosis altas y dado que se suele dar asociado al Cd (elemento muy tóxico) su incremento en una corriente fluvial puede informar sobre una potencial presencia indeseable de este último metal en el agua.

1.4 Referencias

1. Carson, B. L.; Ellis, H. V.; McCann, J. L., *Toxicology and Biological Monitoring of Metals in Humans*. Lewis Publishers: Chelsea. Michigan, 1986.

2. Goyer, R. A., Toxic effects of metals. In *Toxicology: The basis science of poisons*, Klaasent, C. D.; Amdur, M. O.; Doull, J., Eds. MacMillan: London, 1986.

3. Bradl, H., *Heavy Metals in the Environment: Origin, Interaction and Remediation*. Academic Press New York, 2005.

4. Stohs, S. J.; Bagchi, D., *Free Radical Biology and Medicine* **1995,** *18* (2), 321-336.
5. Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M. T. D., *Current Medicinal Chemistry* **2005,** *12* (10), 1161-1208.
6. Marín, R., *Química, Microbiología, Tratamiento y Control Analítico de Aguas: Una Introducción Al Tema*. Nanuk, S.L.: Madrid, 1996.
7. Wittman, G., Toxic Metals. En: , Chapt B. (Eds). , pp 3-70. In *Metal Pollution in the Aquatic Environment*, Förstner, U., and Wittmann, G. , Ed. Springer: Berlin, 1981.
8. Bryan, G. W.; Langston, W. J., *Environmental Pollution* **1992,** *76* (2), 89-131.
9. Wood, J. M., *Science* **1974,** *183* (4129), 1049-1052.
10. Brummer, G. W., *Heavy metal species, mobility and availability in soils*. Springer: Berlin, 1986.
11. Stumm, W.; Morgan, J. J., *Aquatic chemistry*. John Wiley Interscience: New York, 1981.
12. Rubio, B.; Nombela, M. A.; Vilas, F., *Marine Pollution Bulletin* **2000,** *40* (11), 968-980.
13. Prosi, F., Heavy metals in aquatic organisms. In *Metal Pollution in the Aquatic Environment* Förstner, U.; Wittmann, G., Eds. Springer: Berlin 1981.
14. Forstner, U.; Ahlf, W.; Calmano, W.; Kersten, M., Sediment criteria development. In *Sediments and environmental Geochemistry*, Heling, D.; Rothe, P.; Förstner, U.; Stoffers, P., Eds. Springer: Berlin, 1990.
15. Van Den Berg, G. A.; Loch, J. P. G.; Winkels, H. J., *Water, Air, and Soil Pollution* **1998,** *102* (3-4), 377-388.
16. Catalan Lafuente, J. G., *Química del Agua*. Alonso S.A.: Madrid, 1981.
17. Campbell, P. G. C.; Tessier, A., *Metals Speciation, Separation and Recovery*. Lewis Publishers: Michigan, 1987.
18. Salomons, W.; Forstner, U., *Heavy metals. Problems and solutions*. Spring Berlin 1995.
19. Chapman, P. M.; Wang, F., *Environmental Toxicology and Chemistry* **2001,** *20* (1), 3-22.
20. Tarascon, J. M.; Armand, M., *Nature* **2001,** *414* (6861), 359-367.
21. Sanità Di Toppi, L.; Gabbrielli, R., *Environmental and Experimental Botany* **1999,** *41* (2), 105-130.
22. Thornton, I., Geochemistry of Cadmium. In *Cadmium in the Environment. Part I.*, Mislin, H. M.; Ravera, O., Eds. Birkhauser Basel, 1986.
23. Dikshith, T. S. S.; Diwan, P. V., *Industrial Guide to Chemical and Drug Safety*. John Wiley & Sons: New York, 2003.
24. Brown, T. D.; Smith, D. N.; Hargis Jr, R. A.; O'Dowd, W. J., *Journal of the Air and Waste Management Association* **1999,** *49* (6), 628-640.
25. Pereira, M. E.; Lillebø, A. I.; Pato, P.; Válega, M.; Coelho, J. P.; Lopes, C. B.; Rodrigues, S.; Cachada, A.; Otero, M.; Pardal, M. A.; Duarte, A. C., *Environmental Monitoring and Assessment* **2009,** *155* (1-4), 39-49.
26. Renzoni, A.; Zino, F.; Franchi, E., *Environmental Research* **1998,** *77* (2), 68-72.
27. Clarkson, T. W., *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* **1997,** *34* (4), 369-403.
28. Body, P. E.; Inglis, G.; Dolan, P. R.; Mulcahy, D. E., *Critical Reviews in Environmental Control* **1991,** *20* (5-6), 299-310.
29. Kashtock , E. M., Lead in Food. In Intentional and Unintentional Contaminants. In *Food and Feed*, American Chemical Society: 2009; Vol. 1020, pp 229-253.

30. Vallee, B. L., *BioFactors* **1988,** *1* (1), 31-36.

31. Tubek, S., *Biological Trace Element Research* **2007,** *119* (1), 1-9.

32. Vallee, B. L.; Falchuk, K. H., *Physiological Reviews* **1993,** *73* (1), 79-118.

33. Knight, S. S.; Cooper, C. M., Insecticide and metal contamination of a mixed cover agricultural watershed. Exeter, UK, 1996; Vol. 33, pp 227-234.

Capítulo 2

Compuestos estudiados

En este capítulo se consideran las sustancias (ligandos) objeto de estudio de la Tesis, así como su complejación con los metales anteriormente referidos. Este Capítulo está dedicado a la descripción de las propiedades de estos ligandos que, en la mayoría de los casos son moléculas de interés ambiental o biológico, y que contienen azufre o selenio. En un primer apartado se exponen las características y diferencias entre los diferentes tipos de ligandos calcógenos (también designados como anfígenos, familia del oxigeno o grupo 16). En los apartados siguientes se describen las características de ligandos que no contienen átomos de S o Se.

2.1 Propiedades fisicoquímicas de S y Se

Las propiedades antioxidantes de los compuestos de azufre se comparan generalmente con las de los compuestos de selenio. Aun así, las actividades antioxidantes del azufre y selenio pueden ser bastante distintas, ya que cada elemento utiliza mecanismos antioxidantes diferentes para impedir daños celulares oxidativos [1]. El azufre y el selenio se encuentran en las proteínas como constituyentes de aminoácidos como la cisteína (Cys), metionina (Met), selenocisteína (SeCys) y selenometionina (SeMet). En muchos casos existe un compuesto de Se análogo al de S, o de propiedades comparables (Figura 2.1). A diferencia de otros aminoácidos, la Cys puede participar en distintos mecanismos redox, incluyendo reacciones de intercambio y radicalarias, así como reacciones de transferencia de átomo-, electrón-, e hidruro [2]. En el cuerpo humano el selenio se encuentra en varios estados de oxidación, exhibiendo cada uno de ellos distintas propiedades químicas (*p. e.* actividad redox, enlace metálico) y distinta actividad biológica. La posición del selenio en la tabla periódica entre los metales y no metales hace de las selenoproteínas catalizadores ideales para muchas transformaciones redox biológicas.

Las diferencias bioquimicamente más pertinentes entre los compuestos de selenio y azufre son la mayor polarizabilidad del Se y el pK_a más bajo de los selenoles (SeH). Estos últimos tienen una dependencia con el pH diferente a la de los tioles, puesto que los selenoles son activos a valores de pH mucho más bajos [3].

Comparando directamente las propiedades fisicoquímicas de azufre y selenio ambos elementos son muy similares (Tabla 2.1). En términos de electronegatividad, estado de oxidación, radio atómico, etc. las diferencias entre selenio y azufre son bastante sutiles, pero el selenio quizás podría ser visto como forma ligeramente “exagerada” del azufre.

Los efectos combinados de las ligeras diferencias fisicoquímicas entre los dos elementos, *i.e.* mayor radio atómico y longitud de enlace un poco más larga en el caso del selenio, así como mayor polarización y menor energía de enlace diatómico, se traducen en las genuinas diferencias bioquímicas entre SeCys y Cys encontradas en proteínas [4].

Las propiedades fisicoquímicas comparables de selenio y azufre (Tabla 2.1) indican que un intercambio de estos dos elementos debería producir efectos similares. Aun así, la cuestión de en qué extensión las propiedades químicas, electroquímicas, quelatantes y farmacológicas de las biomacromoléculas cambiarían como consecuencia de tal intercambio ha captado el interés de muchos grupos de investigación [5].

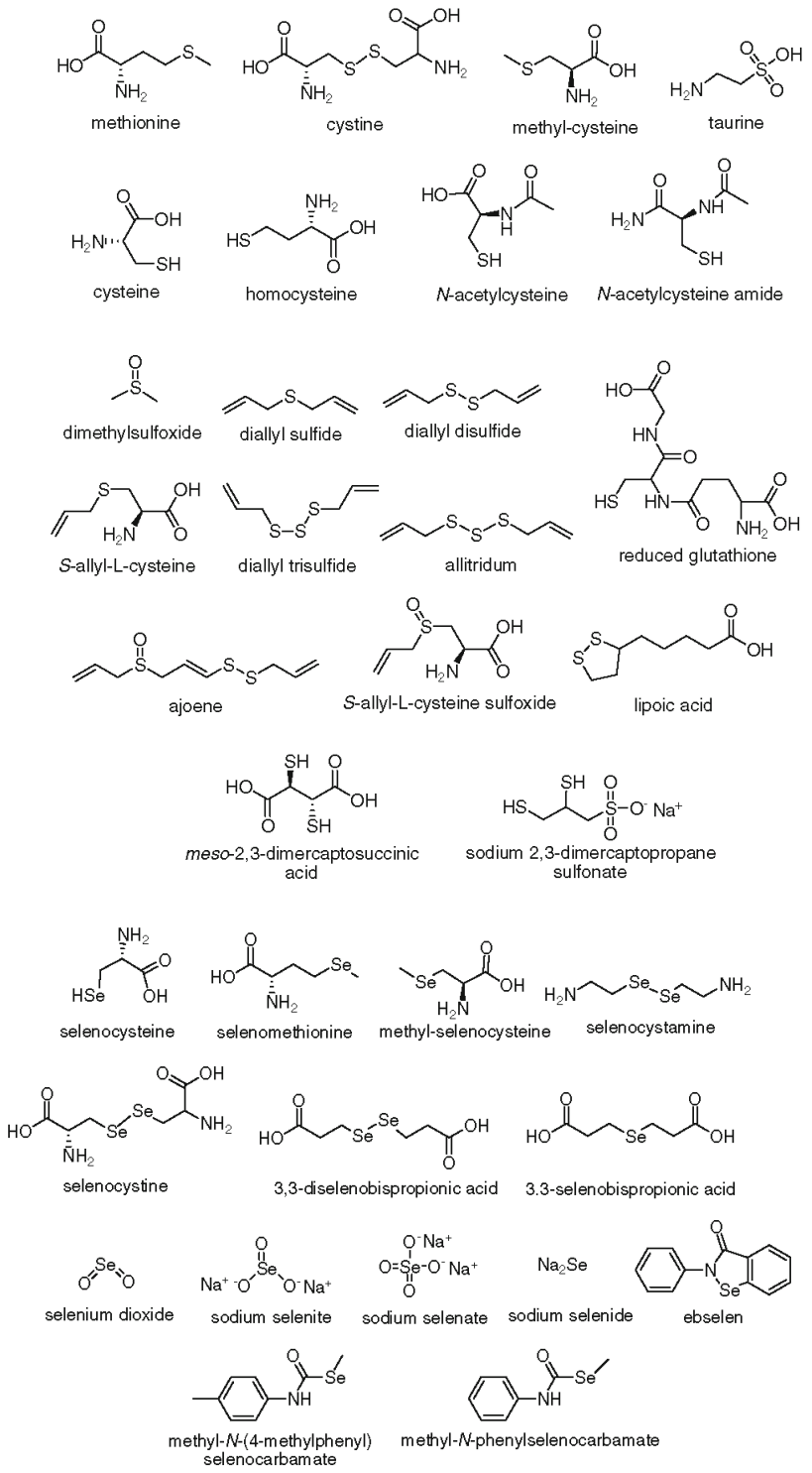


Figura 2.1 – Ejemplos de algunos compuesto de S y Se que se pueden considerar análogos o que tienen una importancia biológica comparable [2].

Tabla 2.1 – Algunas propiedades fisicoquímicas de los elementos calcógenos más significativos [6].

Properties		X = oxygen	X = sulfur	X = selenium	X = tellurium
Electronegativity		3.44	2.58	2.55	2.1
Covalent radius	(Å)	0.73	1.02	1.17	1.35
Bond length C^{β}–X^{γ}	(Å)	1.43	1.82	1.95–1.99	2.4
Bond length X^{γ}–X^{δ}	(Å)	—	2.03	2.33	—
Distance C^{α}	(Å)	—	5.7	5.1	—
Van der Waals radii	(Å)	1.52	1.8	1.9	2.06

2.2 Tioles

Como se ha comentado antes, en el medio ambiente y en los organismos vivos los metales pesados se asocian con diferentes sustancias, formando complejos estables, igual que los oligoelementos presentes en los organismos forman complejos con las enzimas, las proteínas y otras sustancias. Entre todos los grupos funcionales responsables de la asociación de metales destaca el grupo tiol (SH), que es muy activo en las células y que reacciona específica y cuantitativamente con muchos compuestos, entre ellos una gran variedad de iones metálicos.

Los iones metálicos que suelen formar sulfuros estables (incluso en presencia de ácidos) también forman complejos estables de baja solubilidad con los tioles, por ejemplo el glutatión (GSH). Los metales como Fe, Mo, Co o Zn forman complejos menos estables con el grupo SH, pero se enlazan con los grupos amino o carboxílico, y de esta manera pueden formar quelatos donde el anillo proporciona una estabilidad extra al enlace S-metal [7].

Entre las funciones generales de los tioles (-SH) y los disulfuros (-SS-) en las células merecen especial consideración tres: *(i)* participación en diferentes sistemas de transporte electrónico; *(ii)* catálisis en enzimas y coenzimas; *(iii)* detoxificación de compuestos potencialmente tóxicos [7].

Algunos tioles endógenos muy importantes encontrados en las células vivas son los siguientes: el aminoácido Cys y su correspondiente disulfuro, la cistina (Cyst), el aminoácido homocisteína (HCys), que se biosintetiza a partir del aminoácido Met; el GSH; el ácido lipóico y los tioles y disulfuros de peso elevado que se refieren a los grupos SH y SS anexados a macromoléculas como enzimas, hormonas, polipéptidos y otras proteínas. A continuación, se consideran algunos de estos compuestos, estudiados en esta Tesis debido a su implicación en las interacciones de las fitoquelatinas y sus fragmentos (Figura 2.2) con los metales pesados. Concretamente, se presenta un resumen detallado sobre sus funciones, biosíntesis y características principales.

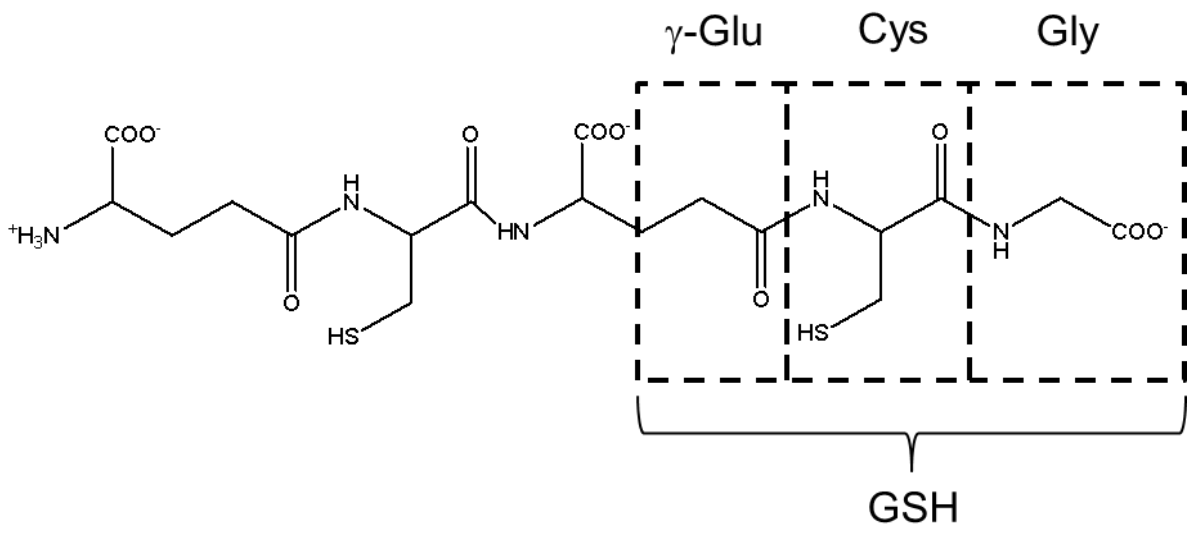


Figura 2.2 – Representación de la fitoquelatina PC_2 en que se destacan los fragmentos más relevantes en esta Tesis: GSH (Glutatión), Glu (Ácido Glutámico), Cys (Cisteína) y Gly (Glicina).

2.2.1 Cisteína

La cisteína (Cys) es uno de los veinte aminoácidos que utilizan las células para sintetizar las proteínas. A pesar de su abundancia en la forma enlazada, sólo una baja fracción de Cys libre está presente en las células o en los flujos extracelulares [8]. Las excepciones se producen en algunas enfermedades metabólicas (cistinosis y cistinuria) donde el disulfuro cistina se acumula en los tejidos o se excreta en cantidades anormales.

El azufre para la síntesis de cisteína proviene del azufre inorgánico, sulfuro y sulfato. Las plantas y los microorganismos utilizan estas fuentes para obtener el azufre de Cys en reacciones de reducción. En cambio, los animales que son incapaces de reducir sulfuro o sulfato obtienen la Cys directamente de la absorción y la reducción subsiguiente de la cistina formada en la hidrólisis de las proteínas de dieta, o también como producto de biosíntesis a partir del aminoácido Met (vía HCys). El último proceso en las plantas y en los microorganismos está invertido con la finalidad de obtener la Met [9].

2.2.2 Glutatión

El glutatión (GSH) es el tiol no proteico más abundante; su concentración en las células es, como mínimo, un orden de magnitud más alta que la de otros tioles [10]. El GSH es un tripéptido con la estructura γ-glutamil-cisteinil-glicina (γ-Glu-Cys-Gly). Los animales, las plantas y los microorganismos tienen capacidad de sintetizarlo y promover su disociación continua. A pesar de su tendencia a oxidarse, mayoritariamente se mantiene en la forma reducida. Su biosíntesis comprende la asociación de los tres aminoácidos con la participación de las moléculas de ATP y Mg^{2+} (estudios *in vitro*). La síntesis tiene lugar en dos etapas, con la formación de γ-glutamil-cisteína (bajo control de la enzima γ-glutamil-cisteína sintetasa) y la subsiguiente formación del GSH (bajo control de la glutatión

sintetasa). En los animales, el GSH se sintetiza principalmente en el hígado. En las plantas, su síntesis depende de la luz porque ésta proporciona el incremento en la concentración de glicina (Gly) [10] debido al proceso de fotorespiración. El GSH puede sintetizarse en el citosol y en los cloroplastos, donde la concentración de GSH es del orden de 1 - 4.5 mM. En las plantas y los animales el GSH desempeña el papel esencial de antioxidante y de regulador redox. En las plantas el GSH regula la absorción del azufre en las raíces, y es utilizado por la GSH S-transferasa en la detoxificación de contaminantes. El GSH es el precursor de las fitoquelatinas, que son los principales agentes complejantes de metales pesados en las plantas [11].

El metabolismo del GSH ha sido ampliamente estudiado, y es bien conocido. La síntesis del GSH ocurre dentro de las células mediante dos reacciones enlazadas [12], controladas enzimáticamente que utilizan ATP y liberan aminoácidos no esenciales como sustratos. En primer lugar, la Cys y el glutamato se combinan, mediante la enzima γ-glutamilcisteína sintetasa [12], y la extensión de la reacción depende de la disponibilidad de la Cys, que usualmente es el factor limitante. La Cys se genera a partir del aminoácido esencial Met, a partir de la degradación de las proteínas de la dieta, o a partir de la regeneración de proteínas endógenas. La segunda reacción de síntesis de GSH combina γ-glutamilcisteína con glicina.

El GSH actúa como ligando polidentado, ofreciendo un gran número y variedad de posibles sitios de enlace: dos oxígenos carboxílicos, tres nitrógenos correspondientes a un grupo amino y dos grupos amida, y un grupo tiol. Sin embargo, debido a su estructura no todos sus potenciales sitios de unión pueden estar simultáneamente coordinados al mismo ion metálico. En consecuencia, su química de coordinación es complicada, ya que se caracteriza por la formación de complejos protonados y polinucleares.

2.2.3 Fitoquelatinas

Las fitoquelatinas (PC_n) son pequeños oligopéptidos sintetizados enzimáticamente a partir del GSH por la enzima *fitoquelatín sintasa* (PCS) (γ-glutamilcisteiniltransferasa; EC), en respuesta a estrés por metales pesados. Las PC_n presentan la estructura general $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Gly, (n=2-11) aunque se han identificado variantes estructurales en algunas especies de plantas, por ejemplo $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-γ-Ala, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Ser, y $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n$-Glu [13; 14]. Se identificaron por primera vez en la levadura *Schizosaccharomyces pombe* [15] y después en plantas [16]. Aunque inicialmente se denominaron cadistidinas, han recibido varios nombres durante años, incluyendo el de metalotioneínas (MTs) de Clase III, hasta la introducción del término fitoquelatinas (PC_n), que es el adoptado en la actualidad. Se agrupan en 5 familias, y se han encontrado en todas las plantas examinadas, microalgas, algunas especies de levaduras y hongos filamentosos (*S. pombe, S. cerevisiae* y *Neurospora crassa*) [16], y en el nematodo *Caenorhabditis elegans* [17].

La actividad enzimática como tal fue identificada por Grill *et al*. (1989) a partir de un cultivo celular de *Silene cucubalis*, y los primeros genes PCS fueron identificados en las plantas *Arabidopsis thaliana* [18] y *Triticum aestivum* [19], la levadura *S. pombe* [18], y más tarde en el nemátodo *C. elegans* [17]. Todas las secuencias aminoacídicas de las PCs conservan un dominio N terminal, responsable de la actividad catalítica de la enzima [20]; y un domino

variable C-terminal, que actúa como elemento sensor de metales [21] y contribuye a la mayor actividad y estabilidad de la proteína, permitiendo que la enzima responda a un espectro más amplio de iones metálicos [20].

2.2.3.1 Mecanismo catalítico de síntesis de fitoquelatinas

El mecanismo catalítico de síntesis de PC_n por la PCS es un mecanismo de sustitución enzimática en que la enzima presenta dos sitios de unión y acilación de los sustratos: uno de alta y otro de baja afinidad por el GSH [22]. La Cys56 (residuo conservado en todas las PCS, que junto con la His_{162} y el Asp_{180} forma la triada catalítica de la enzima presente en el extremo N-terminal), es indispensable para la síntesis de PC_n, y representa el primer sitio de acilación; mientras que el segundo sitio probablemente se localiza en el dominio C-terminal [23]. En primer lugar se produce el ataque nucleofílico de la Cys56 (del centro activo de la enzima) sobre el C carbonílico del GSH (Figura 2.3), formándose el intermediario γGlu-Cys~acil-enzima (Figura 2.3) y liberándose la Gly del GSH. Estos dos pasos son independientes de la presencia de metal en el medio. En presencia de Cd^{2+} (u otro metal), se da también la unión de la molécula aceptora (GSH o PC_n) al segundo sitio de acilación de la enzima [24]. Se produce entonces el ataque nuceofílico de la molécula aceptora sobre el intermediario γGlu-Cys~acil-enzima (Figura 2.3), resultando así la reacción de transpeptidación que comporta la síntesis de PC_n (PC_2 o PC_{n+1}).

Se cree que la principal función de las PC_n es la detoxificación de metales pesados. Hasta ahora se ha demostrado que las PC_n participan en la detoxificación de Cd, As y Hg [14, 16, 19, 21, 25]. La contaminación ambiental por la exposición a grandes cantidades de metales como Cd, As o Hg, es un fenómeno relativamente reciente debido a las actividades industriales humanas [17]. Por tanto, cabe preguntarse si esto puede haber representado una presión evolutiva suficiente para mantener los genes PCS en todo el reino vegetal y en otros organismos, muchos de los cuales no presentan PC_n. Se desconoce también por qué los genes PCS se expresan constitutivamente en organismos que no presentan PC_n, e incluso en varios órganos de la planta que no están expuestos a metales [26].

Para explicar esto actualmente hay dos hipótesis. La más reciente es que la PCS desempeñe una importante función en el catabolismo del GSH (Figura 2.3). La única actividad catalítica de la PCS procariota ($NsPC_n$) es precisamente la hidrólisis del GSH [27]. Recientemente se ha demostrado que las PCSs de *A. thaliana* ($AtPC_n$) y *S. cucubalis* ($ScPC_n$) pueden hidrolizar conjugados de GSH eliminando la Gly [28]. Se cree que esta reacción representa el primer paso del catabolismo de conjugados de GSH en plantas, y que no excluye la biosíntesis de PC_n por estas PCSs.

La otra hipótesis es que las PCn puedan estar implicadas en el mantenimiento de la homeostasis de metales esenciales [29]. Recientemente se ha demostrado que la síntesis de PC_n contribuye significativamente a la detoxificación de Zn^{2+} en *A. thaliana* [30]. Además se ha comprobado la existencia de una elevada tolerancia a exceso de Zn^{2+} en *Brassica juncea* transformada con el gen de la PCS de *A. thaliana* ($AtPC_n$) [31].

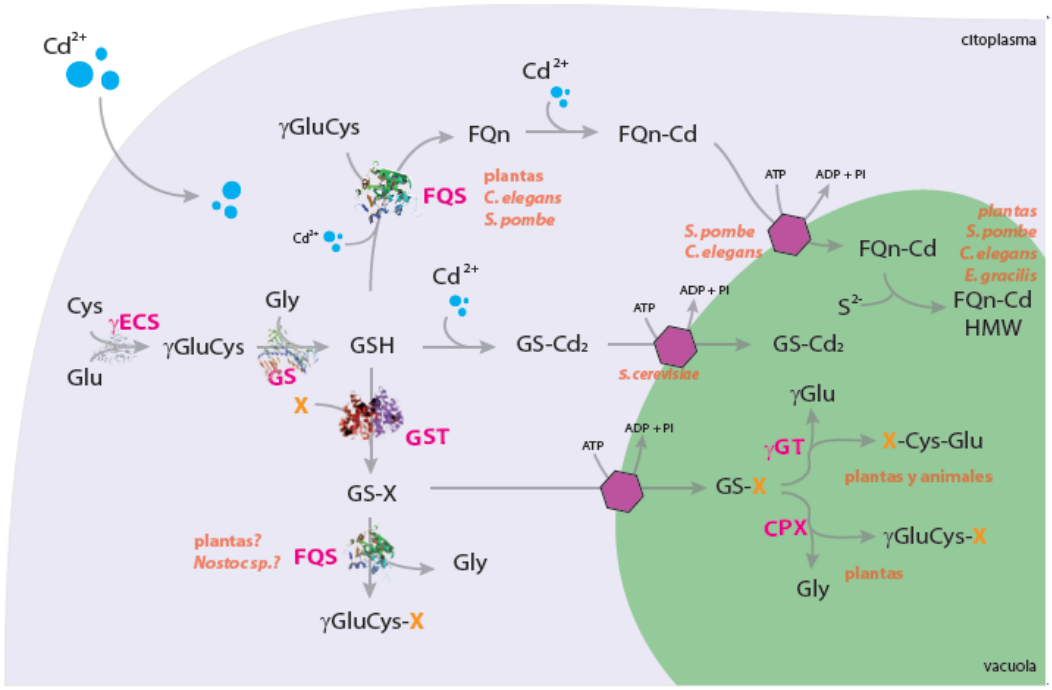


Figura 2.3 – Representación esquemática del metabolismo celular del GSH en distintos organismos. γECS: γ-glutamil cisteinil sintasa, GS: glutation sintasa, GST: glutation-S-transferasa, FQS: fitoquelatín sintasa, γGT, γ-glutamil transpeptidasa, CPX: carboxipeptidasa, X: xenobiótico, GSH: glutation, GSH-Cd_2: complejo Cd-GSH, FQ_n: fitoquelatina, FQ_n- Cd: complejo FQ-Cd, FQ_n-Cd HMW: complejo FQ-Cd de gran masa molecular [21].

2.2.3.2 Mecanismo de detoxificación de metales por fitoquelatinas

El mecanismo de detoxificación es más complejo que una simple quelación del metal por las PC_n. El Cd debe unirse a GSH o PC_n, para formar complejos tiolato-metal que se unan a la enzima PCS activándola. Las PC_n sintetizadas en el citosol enlazan los iones de Cd, formando los complejos $CdPC_n$ de bajo peso molecular (LMW $CdPC_n$) (Figura 2.3), que entran en las vacuolas a través de transportadores de tipo ABC. Dentro de éstas, los complejos $CdPC_n$ se combinan entre sí, uniéndose a más iones Cd y formando los complejos $CdPC_n$ de alto peso molecular (HMW $CdPC_n$), que además están estabilizados por átomos de azufre [21] (Figura 2.4). En plantas y levaduras se ha comprobado la compartimentalización de estos complejos en vacuolas. En *S. pombe* se ha demostrado que los mutantes *hmt1*, deficientes en un transportador vacuolar de tipo ABC, presentan un fenotipo sensible a Cd [32]. Igualmente, en *C. elegans* existe otro transportador semejante [33], y además se ha comprobado que varias mutaciones que afectan a transportadores ABC confieren sensibilidad a metales pesados.

Las PC_n son los compuestos sintetizados por las plantas para reducir el efecto tóxico debido a su exposición a un exceso de metales pesados. La función de dichas macromoléculas es la de secuestrar y detoxificar el ion metálico en exceso [16, 21], a través de la formación de complejos metal- PCn de extraordinaria estabilidad.

Desde un punto de vista funcional las PCn son análogas a las MTs [25a]. De hecho, ambas tienen la posibilidad, gracias a los numerosos grupos sulfidrilos que poseen, de enlazar los metales tóxicos para el organismo y, por consiguiente, tener luego una acción detoxificante.

Las PC_n, debido a su capacidad de secuestrar los metales, pueden contribuir a la homeostasis celular del ion metálico. Ésta es considerada la principal función de las PC. Esta detoxificación metálica ha sido demostrada utilizando metales como el Cd o el Cu en cultivos de células vegetales en suspensión [14, 16, 21-22, 25a, 30, 33].

2.2.3.3 Fitoquelatinas y fitorremediación

La fitorremediación se define como el uso de plantas y la microbiota asociada, enmiendas de suelo y técnicas agronómicas para eliminar, contener o neutralizar el efecto de los contaminantes [34 35]. Se han estudiado cierto grupo de plantas por su tolerancia a concentraciones extremas de metales, tanto en suelos naturales como antropogénicos [36], gracias a mecanismos fisiológicos para resistir, tolerar y sobrevivir en estos suelos [37].

Las plantas hiperacumuladoras sintetizan quelatos (como PC_n, ácidos orgánicos, aminoácidos o fenoles de tipo flavonoides) que detoxifican los iones metálicos mediante la formación de complejos y/o secuestrando los metales desde zonas con un metabolismo activo (citoplasma). Estos complejos orgánicos menos tóxicos son llevados a compartimentos celulares con poca actividad metabólica (pared celular, vacuolas), donde son almacenados en forma de compuesto orgánico o inorgánico.

La fitoextracción (Figura 2.4), también llamada fitoacumulación, implica la acumulación y la translocación de metales pesados de las raíces hacia las partes de la planta fácilmente cosechables, eliminando los metales del suelo [36]. Esta técnica de fitorremediación se ha propuesto para disminuir las concentraciones tóxicas de metales de suelos contaminados, para descontaminar y restaurar la fertilidad de áreas contaminadas.

La fitoextracción mediante plantas hiperacumuladoras permite evitar excavaciones extensivas, elevados costes o pérdidas de suelo superficial, asociadas con las prácticas de remediación tradicional. Además, pueden ser un interesante recurso fitogenético [38].

Sin embargo, la fitorremediación también tiene sus desventajas. El principal inconveniente de esta técnica está relacionado con las características de las plantas, ya que deben estar capacitadas para tolerar la toxicidad de los metales, las condiciones del suelo y el clima. Esta técnica también está limitada por la profundidad de la raíz de las plantas, que debe ser capaz de alcanzar el contaminante. Además, es un método de remediación lento si consideramos, por ejemplo, que la rehabilitación de un suelo mediante la acumulación de metales en las plantas a menudo lleva años. Otro factor a considerar es la biodisponibilidad de los contaminantes, ya que solo una fracción de éstos está disponible. Sin embargo, es muy importante considerar que la fitorremediación no es excluyente, sino que se puede combinar con otras tecnologías [35, 39, 40].

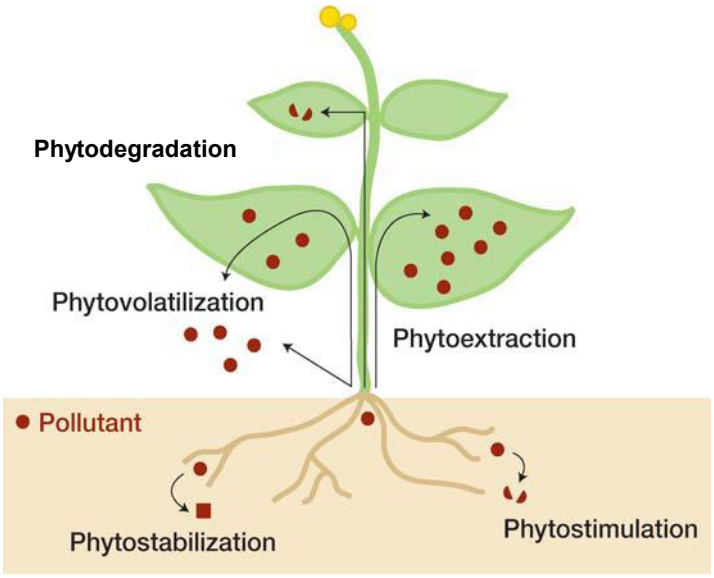


Figura 2.4 – Posibles destinos de agentes contaminantes (representado por círculos) en el proceso de fitorremediación [35].

2.3 Selenio

El selenio (Se) es un elemento traza esencial de interés clínico y nutricional, cuyas funciones biológicas (antioxidante y catalítica) se ejercen a través de las selenoproteínas. El selenio es necesario para el funcionamiento adecuado del sistema inmune, podría tener efectos beneficiosos en el tratamiento del SIDA y parece ser un oligoelemento esencial para contrarrestar la virulencia de la hepatitis [41]. Por otro lado, una ingesta adecuada de selenio puede prevenir el riesgo de padecer cáncer. Además, en el contexto de sus efectos sobre la salud, el bajo aporte de selenio en algunas partes del mundo, entre los que se encuentran algunos países europeos, es motivo de preocupación.

Por todo ello, es esencial el conocimiento de los diferentes procesos físicos, químicos y bioquímicos en los que este elemento y sus especies están implicados. Este hecho queda reflejado por el gran interés que el selenio está despertando en los últimos años en la comunidad científica por su incidencia en la salud pública.

2.3.1 Selenio en el medio ambiente

Las fuentes que contribuyen a la presencia del elemento en la atmósfera pueden ser de origen natural o antropogénico. Los procesos de emisión natural de selenio incluyen la erosión de las rocas y suelos, emisiones volcánicas y la actividad de microorganismos y plantas [42]. Por su parte, el gas volcánico es la más importante de las fuentes naturales seguido de los procesos de biometilación del selenio presente en suelos, plantas, aguas y sedimentos por la acción de bacterias, hongos, algas y plantas superiores que liberan compuestos volátiles de selenio fundamentalmente dimetilselenio (DMSe), aunque también dimetildiselenio (DMDSe) y otras especies similares [43]. Las emisiones naturales del

selenio a la atmósfera constituyen un proceso fundamental dentro del ciclo biogeoquímico del selenio puesto que contribuyen entre 50 y 70% al flujo global del selenio [44]. Las principales fuentes de selenio procedentes de la actividad antropogénica son [45]:

- la combustión de carburantes fósiles;
- las fundiciones y refinerías;
- las fábricas de vidrio y cerámica, y otras industrias.

Entre las fuentes antropogénicas, la combustión de carbón y combustibles fósiles es la principal fuente de incorporación del selenio al aire. Aunque en las combustiones se forma SeO_2, la presencia de SO_2 hace que se reduzca con rapidez a selenio elemental, que se une a cenizas y a partículas atmosféricas. De manera global se ha estimado en 7700-8000 Tm $año^{-1}$ la cantidad vertida a la biosfera como resultado de la combustión de fósiles y de actividades industriales y agrícolas [46]. De hecho, a través de la agricultura se drena agua con un contenido medio de selenio de 1.4 µg L^{-1} [47], considerándose que el vertido de selenio al mar es de unas 800 toneladas anuales [48]. Sin embargo, no existen indicaciones de aumento global en la concentración de selenio en la atmósfera, posiblemente debido a una rápida sedimentación del selenio atmosférico [43]. Tampoco existen evidencias de aumento global de la concentración de selenio en el agua de mar, considerándose el valor de 0.09 µg L^{-1} constante en el tiempo y el espacio. La contaminación por selenio en los ecosistemas acuáticos es de especial interés en extensas zonas del planeta. Por ello, en la actualidad se están realizando distintos estudios encaminados a desarrollar métodos de recuperación de aguas y suelos contaminados por selenio mediante procesos biológicos y/o químicos [49].

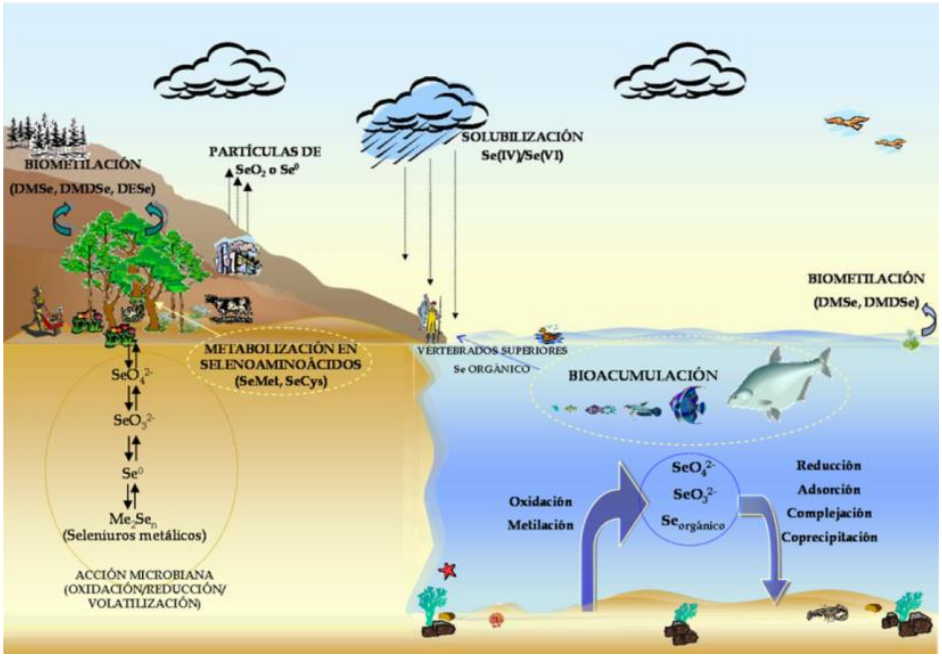


Figura 2.5 – Distribución del Se en los diferentes compartimentos medioambientales.

La concentración, transformación, movilidad y acumulación de selenio en un ambiente dado depende de numerosos factores tales como el pH, las condiciones redox, la temperatura, la presencia de determinadas materias minerales, así como de la actividad microbiana y antropogénica. El conjunto de estos procesos está esquematizado en la Figura 2.5 donde se indican algunas de las especies identificadas en los distintos compartimentos ambientales. No obstante, muchas especies de selenio y sus mecanismos bioquímicos son aún desconocidos.

2.3.2 Plantas

En las plantas, el selenio se encuentra en forma de compuestos orgánicos, fundamentalmente como selenometionina (SeMet). En granos de cereales la SeMet constituye el 50% del selenio total [50]. Otros compuestos identificados en plantas son seleno-metil-selenometionina (Se-metil-SeMet), selenocistina (SeCyst) y seleno-metilselenocistina (Se-metil- SeCyst) [51].

Las plantas son capaces de incorporar selenio a partir del suelo, agua o atmósfera como se enseña en la Figura 2.6, transportarlo y metabolizar distintas especies del elemento, empleando para todo ello mecanismos análogos a los del azufre. La capacidad para absorber, acumular y metabolizar selenio varía de unas especies a otras. Así, existen diferencias sustanciales en cuanto a la concentración y tolerancia en función de la especie vegetal [51]. Existen especies de plantas acumuladoras de selenio, generalmente no comestibles, que crecen en suelos seleníferos y pueden alcanzar concentraciones de entre 100 y 10000 μg g^{-1}. En estas plantas la concentración de selenio llega a ser superior a la del suelo en el que crecen. En este grupo se incluyen varias especies del género *Astragalus*, la *Oonopsis condensaya* y la *Stanleya pinnata* entre otras, mientras que en plantas no acumuladoras, entre las que se encuentra la mayoría de las plantas de cultivo, el contenido en selenio varía entre 0.05-1 μg g^{-1} [52].

La absorción de Se tiene lugar preferentemente en forma de SeO_4^{2-}, anión que interfiere en las reacciones bioquímicas esenciales de las plantas, al sustituir al azufre e incorporarse a los aminoácidos proteicos para formar selenocisteína (SeCys) y SeMet [51-52]. En el caso de las plantas acumuladoras, el selenio se incorpora a aminoácidos no proteicos por lo que no interfiere en el metabolismo de las mismas. En algunas ocasiones, los compuestos de selenio son transformados por plantas y algas a formas volátiles (DMSe, DMDSe y dietilselenio) como mecanismo de defensa frente a la toxicidad [51] observándose importantes diferencias en cuanto a las especies volatilizadas en función de la especie vegetal. Las plantas acumuladoras producen DMDSe, mientras que las no acumuladoras volatilizan una menor cantidad de selenio en forma de DMSe [53]. Tal es la importancia del selenio para el desarrollo de las plantas y su influencia en la cadena trófica, que incluso algunos países han tomado la decisión de incorporarlo artificialmente a sus suelos cuando éstos son deficitarios. Así, el hecho de que sólo un 5% del selenio del suelo de Finlandia fuera disponible para las plantas, motivó que se incorporara artificialmente en forma de seleniato en los fertilizantes de este país [54].

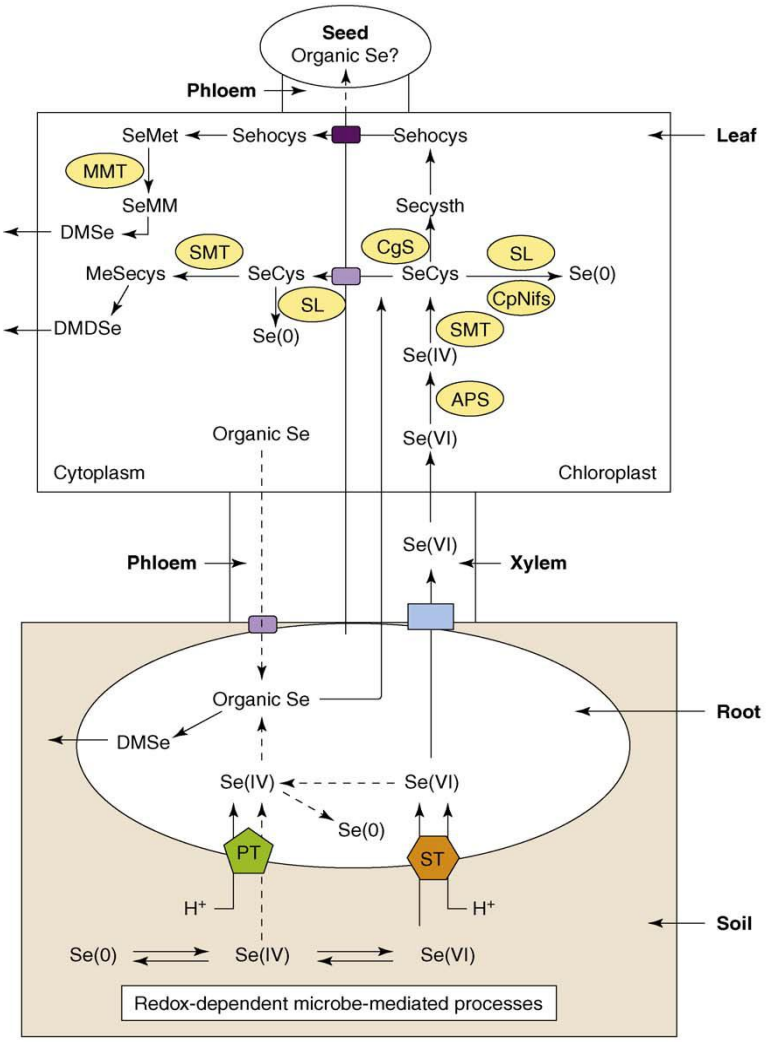


Figura 2.6 – Visión general del metabolismo del Se en plantas [52].

2.3.3 Relevancia Biológica del Se

La evidencia de los efectos beneficiosos del selenio para los seres vivos es relativamente reciente. Fue descrita por primera vez en 1957 por Schwartz y Foltz [55], que constataron que el selenio protegía a ratas deficientes en vitamina E de necrosis hepática y a pollos de diátesis exudativa y degeneraciones necróticas. Pero su esencialidad nutricional no se demostró hasta 1973 cuando se comprobó su función bioquímica en animales [56]. Se descubrió una función biológica importante del selenio debida a su acción reductora, a través de la SeCys presente en la enzima *glutatión peroxidasa* (GP_x).

Desde entonces se han identificado otras funciones bioquímicas y fisiológicas del selenio relacionadas con su presencia como selenoproteínas en los tejidos y los fluidos biológicos de los mamíferos. El número de selenoproteínas en animales ha sido estimado entre 30 y 50 [57]. En la actualidad se han identificado unas 35 selenoproteínas; de ellas, 18 han sido secuenciadas [58] y se conoce la función enzimática de más de 10. A continuación se presenta una breve descripción de dos enzimas, una involucrada en procesos de reducción

del GSH (GPx) y otra en mecanismos de reducción de la toxicidad de metales (Selenoproteína P).

Las GPx fueron descubiertas en 1957 por Mills, aunque hasta 1973 no se demostró que el selenio era un componente esencial de las mismas [59]. Al ser las primeras selenoproteínas descritas, su estructura y función son las que están mejor definidas. La principal función de esta familia de selenoproteínas es la protección de las células frente a la oxidación por parte de especies activadas de oxígeno como superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidoxilo. Para ello las GPxs catalizan la reducción de peróxidos e hidroperóxidos que podrían causar daños a células y tejidos a través de la oxidación del glutatión reducido (GSH) en glutatión oxidado (GSSG) (Figura 2.7).

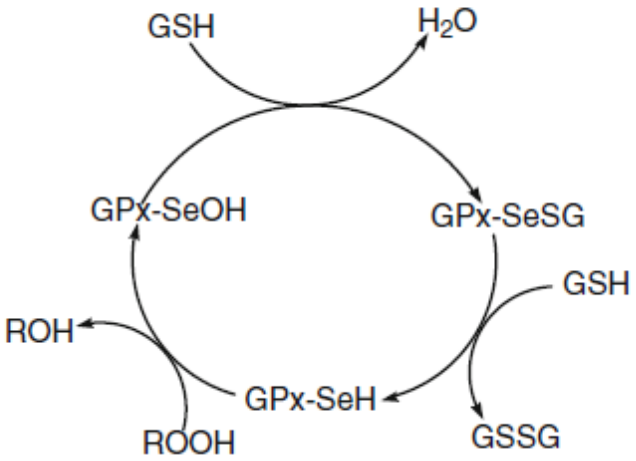


Figura 2.7 – Eliminación del peróxido de hidrógeno de las células y su transformación en H_2O por la enzima glutatión peroxidasa.

La principal participación fisiológica de la GSH-Px es aportar una segunda línea de defensa contra los hidroperóxidos, manteniendo niveles adecuadamente bajos de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) dentro de las células, reduciendo de esta forma el estrés oxidativo. Como consecuencia, el selenio, como parte de las GPx, es considerado un agente antioxidante y tiene funciones independientes de la vitamina E, el Fe (como catalasa) y el Zn y el Cu (como superóxido dismutasa) [60]. Estos antioxidantes evitan la acción de los radicales libres, que pueden dañar el ADN, proteínas, carbohidratos y lípidos en el organismo [61].

La Selenoproteína P es un polipéptido glicosilado de unos 57 kDa, mayoritario en el plasma sanguíneo de los mamíferos. Contiene aproximadamente la mitad del selenio total presente en el plasma y es la única selenoproteína caracterizada que contiene múltiples residuos SeCys [62]. En estados carenciales de selenio, su síntesis parece ser preferente frente a la de las GPx [63].

Su función biológica no es muy clara, aunque originalmente se pensó que tenía una función de transporte, distribuyendo el Se a los diferentes órganos. Aunque no se admite de forma generalizada, el alto número de residuos de SeCys por molécula y su facilidad para

degradarse han hecho pensar en un posible papel como forma de transporte de dicho aminoácido a través del organismo para utilizarlo en la síntesis de otras proteínas [64]. También se ha asumido que actúa como antioxidante extracelular contribuyendo a la descomposición del peroxinitrito, acción que comparte con otras selenoproteínas. Esta función antioxidante la llevaría acabo principalmente en el sistema vascular y además podría proteger de la oxidación a las membranas celulares [65]. Se sintetiza principalmente en hígado, corazón y pulmones, desde donde se libera al aparato circulatorio.

Por otro lado, es capaz de unirse a metales pesados debido a que posee gran número de residuos de histidina y cisteína. En este sentido, varios trabajos han relacionado a la Selenoproteína P con la capacidad del selenio para disminuir la toxicidad de los metales pesados [66,67], concretamente Hg, Ag y Cd [67]. El mecanismo de acción sugerido [66] implica la formación de complejos metal-selenio que se unen posteriormente a la Selenoproteína P originando complejos ternarios del tipo $[(\text{Se-metal})_n]_m$-Selenoproteína P.

2.4 Referencias

1. Jacob, C.; Giles, G. I.; Giles, N. M.; Sies, H., *Angewandte Chemie - International Edition* **2003,** *42* (39), 4742-4758.
2. Battin, E. E.; Brumaghim, J. L., *Cell Biochemistry and Biophysics* **2009,** *55* (1), 1-23.
3. Wessjohann Ludger, A.; Schneider, A.; Abbas, M.; Brandt, W., Selenium in chemistry and biochemistry in comparison to sulfur. In *Biological Chemistry*, 2007; Vol. 388, p 997.
4. Stadtman, T. C., *Annual Review of Biochemistry* **1990,** *59*, 111-127.
5. Steinmann, D.; Nauser, T.; Koppenol, W. H., *Journal of Organic Chemistry* **2010,** *75* (19), 6696-6699.
6. Muttenthaler, M.; Alewood, P. F., *Journal of Peptide Science* **2008,** *14* (12), 1223-1239.
7. Bannai, S.; Tateishi, N., *Journal of Membrane Biology* **1986,** *89* (1), 1-8.
8. Chapman, H. A.; Riese, R. J.; Shi, G. P., Emerging roles for cysteine proteases in human biology. 1997; Vol. 59, pp 63-88.
9. Makarova, K. S.; Aravind, L.; Koonin, E. V., *Trends in Biochemical Sciences* **2000,** *25* (2), 50-52.
10. Wu, G.; Fang, Y.-Z.; Yang, S.; Lupton, J. R.; Turner, N. D., *The Journal of Nutrition* **2004,** *134* (3), 489-492.
11. Meister, A., *Journal of Biological Chemistry* **1988,** *263* (33), 17205-8.
12. Griffith, O. W.; Mulcahy, R. T., The enzymes of glutathione synthesis: γ-glutamylcysteine synthetase. 1999; Vol. 73, pp 209-267.
13. Rauser, W. E., *Plant Physiology* **1995,** *109* (4), 1141-1149.
14. Zenk, M. H., *Gene* **1996,** *179* (1), 21-30.
15. Kondo, N.; Imai, K.; Isobe, M., *Tetrahedron Letters* **1984,** *25* (35), 3869-3872.
16. Grill, E.; Winnacker, E. L.; Zenk, M. H., *Science* **1985,** *230* (4726), 674-676.
17. Clemens, S.; Schroeder, J. I.; Degenkolb, T., *European Journal of Biochemistry* **2001,** *268* (13), 3640-3643.

18. Ha, S. B.; Smith, A. P.; Howden, R.; Dietrich, W. M.; Bugg, S.; O'Connell, M. J.; Goldsbrough, P. B.; Cobbett, C. S., *Plant Cell* **1999,** *11* (6), 1153-1163.
19. Clemens, S.; Kim, E. J.; Neumann, D.; Schroeder, J. I., *EMBO Journal* **1999,** *18* (12), 3325-3333.
20. Ruotolo, R.; Peracchi, A.; Bolchi, A.; Infusini, G.; Amoresano, A.; Ottonello, S., *Journal of Biological Chemistry* **2004,** *279* (15), 14686-14693.
21. Cobbett, C. S., *Plant Physiology* **2000,** *123* (3), 825-832.
22. Vatamaniuk, O. K.; Mari, S.; Lu, Y. P.; Rea, P. A., *Journal of Biological Chemistry* **2000,** *275* (40), 31451-31459.
23. Clemens, S., *Journal of Plant Physiology* **2006,** *163* (3), 319-332.
24. Rea, P. A.; Vatamaniuk, O. K.; Rigden, D. J., *Plant Physiology* **2004,** *136* (1), 2463-2474.
25. (a) Cobbett, C.; Goldsbrough, P., *Annual Review Of Plant Biology* **2002,** *53*, 159-182; (b) Gawel, J. E.; Trick, C. G.; Morel, F. o. M. M., *Environmental Science & Technology* **2001,** *35* (10), 2108-2113.
26. Cherian, S.; Oliveira, M. M., *Environmental Science and Technology* **2005,** *39* (24), 9377-9390.
27. Harada, E.; Von Roepenack-Lahaye, E.; Clemens, S., *Phytochemistry* **2004,** *65* (24), 3179-3185.
28. Blum, R.; Beck, A.; Korte, A.; Stengel, A.; Letzel, T.; Lendzian, K.; Grill, E., *Plant Journal* **2007,** *49* (4), 740-749.
29. Rauser, W. E., *Annual Review of Biochemistry* **1990,** *59*, 61-86.
30. Tennstedt, P.; Peisker, D.; Böttcher, C.; Trampczynska, A.; Clemens, S., *Plant Physiology* **2009,** *149* (2), 938-948.
31. Gasic, K.; Korban, S. S., *Plant Molecular Biology* **2007,** *64* (4), 361-369.
32. Ortiz, D. F.; Kreppel, L.; Speiser, D. M.; Scheel, G.; McDonald, G.; Ow, D. W., *EMBO Journal* **1992,** *11* (10), 3491-3499.
33. Vatamaniuk, O. K.; Bucher, E. A.; Sundaram, M. V.; Rea, P. A., *Journal of Biological Chemistry* **2005,** *280* (25), 23684-23690.
34. Cunningham, S. D.; Ow, D. W., *Plant Physiology* **1996,** *110* (3), 715-719.
35. Pilon-Smits, E., *Annual Review Of Plant Biology* **2005,** *56*, 15-39.
36. Raskin, I.; Smith, R. D.; Salt, D. E., *Current Opinion in Biotechnology* **1997,** *8* (2), 221-226.
37. Cunningham, S. D.; Berti, W. R.; Huang, J. W., *Trends in Biotechnology* **1995,** *13* (9), 393-397.
38. Salt, D. E.; Blaylock, M.; Kumar, N. P. B. A.; Dushenkov, V.; Ensley, B. D.; Chet, I.; Raskin, I., *Bio/Technology* **1995,** *13* (5), 468-474.
39. Weis, J. S.; Weis, P., *Environment International* **2004,** *30* (5), 685-700.
40. Suresh, B.; Ravishankar, G. A., *Critical Reviews in Biotechnology* **2004,** *24* (2-3), 97-124.
41. Rayman, M. P., *Lancet* **2000,** *356* (9225), 233-241.
42. Cutter, G. A., *Analytical Chemistry* **1985,** *57* (14), 2951-2955.
43. Wen, H.; Carignan, J., *Atmospheric Environment* **2007,** *41* (34), 7151-7165.
44. Amouroux, D.; Donard, O. F. X., *Marine Chemistry* **1997,** *58* (1-2), 173-188.
45. Bennett, B. G., *Science of The Total Environment* **1983,** *31* (2), 117-127.
46. Lemly, A. D., *Biomedical and Environmental Sciences* **1997,** *10* (4), 415-435.

47. Wu, L., *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004,** *57* (3), 257-269.

48. Lemly, A. D., *Ecotoxicology and Environmental Safety* **2004,** *59* (1), 44-56.

49. Herbel, M. J.; Johnson, T. M.; Tanji, K. K.; Gao, S.; Bullen, T. D., *Journal of Environmental Quality* **2002,** *31* (4), 1146-1156.

50. Schrauzer, G. N., *Journal of Nutrition* **2000,** *130* (7), 1653-1656.

51. Terry, N.; Zayed, A. M.; De Souza, M. P.; Tarun, A. S., Selenium in higher plants. 2000; Vol. 51, pp 401-432.

52. Zhu, Y. G.; Pilon-Smits, E. A. H.; Zhao, F. J.; Williams, P. N.; Meharg, A. A., *Trends in Plant Science* **2009,** *14* (8), 436-442.

53. Zayed, A.; Lytle, C. M.; Terry, N., *Planta* **1998,** *206* (2), 284-292.

54. Sors, T. G.; Ellis, D. R.; Salt, D. E., *Photosynthesis Research* **2005,** *86* (3), 373-389.

55. Schwarz, K.; Foltz, C. M., *Journal of the American Chemical Society* **1957,** *79* (12), 3292-3293.

56. Rotruck, J. T.; Pope, A. L.; Ganther, H. E.; Swanson, A. B.; Hafeman, D. G.; Hoekstra, W. G., *Science* **1973,** *179* (4073), 588-590.

57. Brown, K. M.; Arthur, J. R., *Public Health Nutrition* **2001,** *4* (2 B), 593-599.

58. Ganther, H. E., *Carcinogenesis* **1999,** *20* (9), 1657-1666.

59. Flohe, L.; Günzler, W. A.; Schock, H. H., *FEBS Letters* **1973,** *32* (1), 132-134.

60. Tapiero, H.; Townsend, D. M.; Tew, K. D., *Biomedicine and Pharmacotherapy* **2003,** *57* (3), 134-144.

61. Brigelius-Flohé, R., *Free Radical Biology and Medicine* **1999,** *27* (9-10), 951-965.

62. Burk, R. F.; Hill, K. E., *Journal of Nutrition* **1994,** *124* (10), 1891-1897.

63. Persson-Moschos, M.; Huang, W.; Srikumar, T. S.; Akesson, B.; Lindeberg, S., *Analyst* **1995,** *120* (3), 833-836.

64. T. Suzuki, K.; Ishiwata, K.; Ogra, Y., *Analyst* **1999,** *124* (12), 1749-1754.

65. Arteel, G. E.; Sies, H., *Environmental Toxicology and Pharmacology* **2001,** *10* (4), 153-158.

66. Sasakura, C.; T. Suzuki, K., *Journal of Inorganic Biochemistry* **1998,** *71* (3–4), 159-162.

67. Edmonds, J. S.; Morita, M., *Applied Organometallic Chemistry* **2000,** *14* (3), 133-145.

Capítulo 3

Técnicas instrumentales y tratamiento de datos

3.1 Técnicas electroanalíticas

La voltamperometría abarca un grupo de métodos electroanalíticos en los que la información sobre el analito se deduce de la medida de la intensidad de corriente en función del potencial aplicado, en condiciones que favorezcan la polarización de un electrodo indicador, o de trabajo. Esta medida se realiza con un consumo mínimo de analito.

Históricamente, el campo de la voltamperometría se desarrolló a partir de la polarografía, que es un tipo particular de voltamperometría que fue descubierto por el químico checoslovaco Jaroslav Heyrovský a principios de los años veinte [1]. Heyrovský fue premiado con el Premio Nobel en Química en 1959 por el descubrimiento y desarrollo de la técnica. La polarografía fue el primer tipo de voltamperometría descubierto y constituye una rama importante de la voltamperometría. Difiere de otros tipos importantes de voltamperometrías en que el electrodo de trabajo es un electrodo de gotas de mercurio (DME).

3.1.1 Técnicas voltamperométricas

En voltamperometría, se aplica a una celda electroquímica, una señal de excitación que es un potencial variable [2, 3, 4]. Esta señal de excitación provoca una respuesta de intensidad de corriente característica en la que se basa el método. En la Figura 3.1 se muestran las formas de cuatro señales de excitación voltamperometricas que corresponden a las técnicas utilizadas en esta tesis. En las Figuras 3.1a y 3.1b se muestran dos señales de excitación de impulsos. Las intensidades de corriente se miden en diferentes momentos durante la vida de estos impulsos. Con la onda de forma triangular que se muestra en la Figura 3.1c, el potencial varía de forma cíclica entre dos valores, primero aumenta linealmente hasta un máximo y después disminuye linealmente con una pendiente del mismo valor numérico hasta su valor original. Este proceso se puede repetir numerosas veces, registrándose la intensidad de corriente en función del tiempo. Un ciclo completo puede durar 100 segundos o más, o completarse en menos de un segundo. En la última columna de la Figura 3.1 se indican los tipos de voltamperometrías que utilizan las diversas señales de excitación. Estas técnicas se tratan en los siguientes apartados.

En los años 60, la polarografía de barrido lineal dejó de ser una herramienta analítica importante en la mayoría de los laboratorios. La razón del descenso en el uso de esta técnica, en otro tiempo popular, no fue sólo la aparición de diversos métodos espectroscópicos más adecuados, sino también los inconvenientes inherentes al método, entre ellos la lentitud, la utilización de instrumentos poco adecuados y, sobre todo, los deficientes límites de detección. Estas limitaciones se han superado con métodos de impulsos y con el desarrollo de electrodos tales como los que se muestran en la Figura 3.1. Se tratarán las dos técnicas de impulsos más importantes, la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV) y la voltamperometría de onda cuadrada (SWV). La idea detrás de todos los métodos polarográficos de impulsos es medir la intensidad en el momento en el que la diferencia entre la curva faradaica deseada y la corriente de carga que interfiere sea grande.

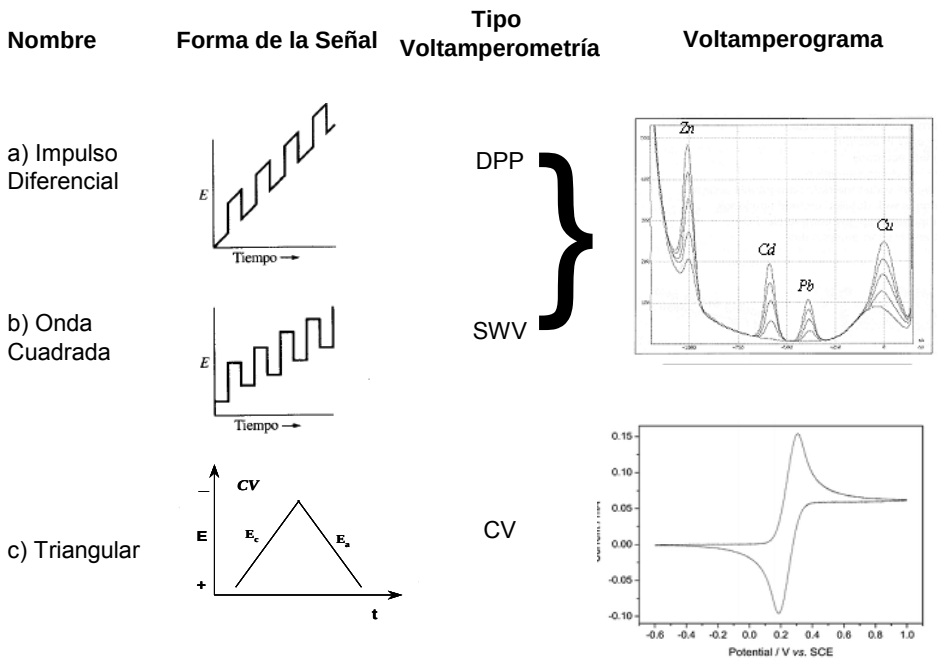


Figura 3.1 – Señales de potencial de excitación utilizada en voltamperometría y las formas de sus respuestas más características.

3.1.1.1 Voltamperometría de Impulsos Diferencial

La Figura 3.2a muestra la señal de excitación que se utiliza en los instrumentos comerciales de voltamperometría diferencial de impulsos (DPV). Se utiliza normalmente en instrumentos digitales e implica la combinación de una señal de salida de impulsos con una señal de escalera. En un caso típico, se aplican impulsos de 50 mV durante los últimos 50 ms de la vida de la gota de mercurio (en el caso de un electrodo SMDE). Aquí de nuevo, para sincronizar el impulso con la gota, ésta se desprende en el momento adecuado por un medio mecánico.

Como se muestra en la Figura 3.2a, se hacen alternativamente dos medidas de intensidad de corriente, una (S_1) se efectúa unos ms antes de aplicar el impulso y otra (S_2) ms antes de acabar el impulso. La diferencia de intensidad por impulso (Δ_i) se registra en función del potencial que aumenta linealmente. Así se obtiene una curva diferencial en forma de pico (Figura 3.2b) la altura del cual es directamente proporcional a la concentración. Para una reacción reversible, el potencial del pico es aproximadamente igual al potencial estándar de la semirreacción.

Una ventaja de los voltamperogramas tipo derivada es que se pueden observar máximos de picos individuales para sustancias que tienen potenciales de semionda que difieren en tan sólo 0.05 V; en cambio, la voltamperometría normal de impulsos (NPV) requiere una diferencia de potenciales de aproximadamente 0.2 V para la resolución de las ondas. Sin embargo, lo más importante es que la DPV aumenta la sensibilidad del método [2]. El aumento de la sensibilidad de esta técnica se debe a la disminución de la contribución de la componente de intensidad capacitiva, una vez que se procede a la sustracción de valores relativamente próximos, permitiendo alcanzar límites de detección, para la generalidad de los analitos, del orden de los 10^{-8} mol L^{-1}.

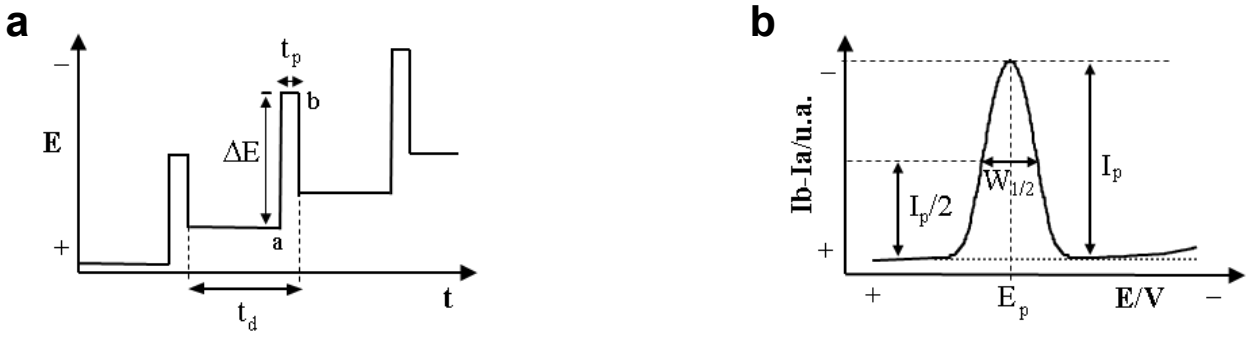


Figura 3.2 – Señal de excitación para DPP y la señal analítica en forma de pico.

3.1.1.2 Voltamperometría de onda cuadrada

La voltamperometría de onda cuadrada (SWV) es un tipo de voltamperometría de impulsos que ofrece la ventaja de una gran velocidad y una elevada sensibilidad (Figura 3.3). Un voltamperograma completo se obtiene en menos de 10 ms. Con un DME, el barrido se lleva a cabo durante los últimos milisegundos de la vida de una única gota, cuando la intensidad de corriente de carga es esencialmente constante.

En SWV, la corriente es medida en intervalos de tiempo muy cortos en la parte final de la onda positiva, al tiempo t_{i1} y en la parte final de la onda, al tiempo t_{i2}, de cada onda cuadrada. La diferencia entre las intensidades de corriente, i_1-i_2, se registra en función del potencial en escalón, y el voltamperograma obtenido es un pico simétrico al obtenido en DPV. La SWV, en similar relación con la DPV, es más rápida y presenta una sensibilidad mayor, ya que la intensidad de corriente global que resulta en la suma de dos corrientes: anódica (fase positiva del impulso, oxidación) y catódica (fase negativa del impulso, reducción). Dado que la SWV produce voltamperogramas en tiempos extremamente cortos, esto la hace adecuada para ser acoplada a otras técnicas instrumentales, como por ejemplo, a la cromatografía líquida para la detección de las especies que van siendo eluidas [3].

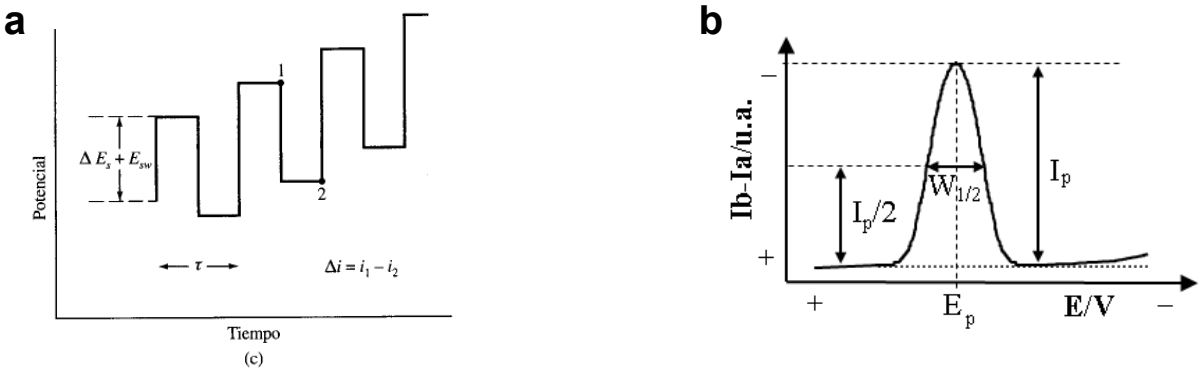


Figura 3.3 – Señal de excitación para SWV y la señal analítica en forma de pico.

3.1.1.3 Voltamperometría Cíclica

En voltamperometría cíclica (CV), la variación de corriente en un electrodo estacionario pequeño colocado en una disolución no agitada es provocada por una señal de potencial de forma triangular, tal como la que se muestra en la Figura 3.1c. El ciclo de excitación se repite a menudo varias veces. Los potenciales a los que tiene lugar la inversión se llaman potenciales de inversión. El intervalo de potenciales de inversión elegido para un experimento dado es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controladas por difusión de uno o más analitos. Dependiendo de la composición de la muestra, la dirección del barrido inicial puede ser negativa (un barrido en la dirección de potenciales más negativos se denomina barrido directo, mientras que uno en la dirección opuesta se llama barrido inverso).

Los parámetros importantes en un voltamperograma cíclico son el potencial de pico catódico (E_{cp}) el potencial de pico anódico E_{ap} la corriente de pico catódica (i_{cp}) y la corriente de pico anódica (i_{ap}) Estos parámetros se definen tal y como se muestra en la Figura 3.4. Para una reacción de electrodo reversible, las corrientes de pico anódica y catódica son aproximadamente iguales, pero de signo opuesto, y la diferencia entre los potenciales de pico es de 0,0592/n, donde n es el número de electrones implicados en la semirreacción.

La voltamperometría cíclica, es una herramienta importante para el estudio de los mecanismos y de las velocidades de los procesos redox, en particular para sistemas orgánicos y organometálicos [4]. Este método es generalmente la primera técnica seleccionada para la investigación de un sistema tratable electroquímicamente [2].

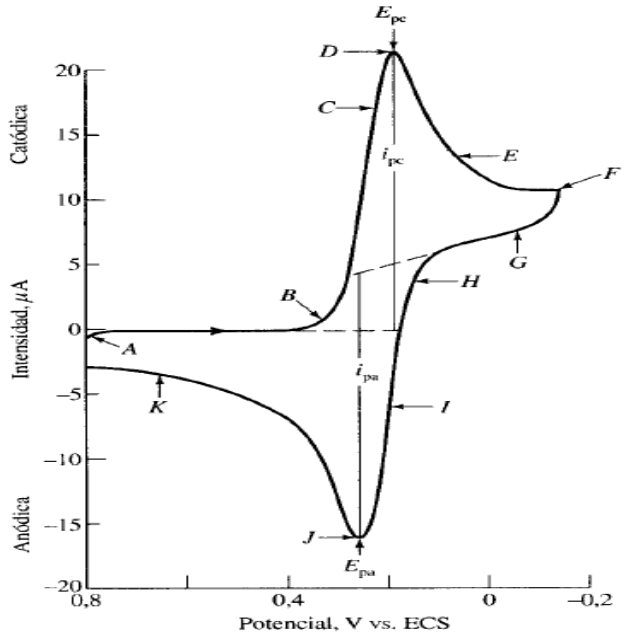


Figura 3.4 – Voltamperograma cíclico típico de una reacción de electrodo reversible para una disolución de $K_3Fe(CN)_6$ en KNO_3.

3.1.2 Electrodos de trabajo

El electrodo de trabajo de un sistema electroquímico es aquél cuyo potencial es controlado automáticamente y varía en función del tipo de técnica o análisis que se vaya a realizar. Su tamaño suele ser reducido, con vistas a favorecer lo más posible su capacidad de polarización. El valor del potencial del electrodo de trabajo se expresa respecto al del electrodo de referencia, que se mantiene constante durante la medida.

El intervalo de potenciales en el que cada uno de estos electrodos puede ser utilizado en disoluciones acuosas varía y depende del material del electrodo y también de la composición de la disolución en la que vaya a estar sumergido el electrodo.

El diseño de nuevos electrodos, tanto en la naturaleza del material como a su configuración y tamaño, ha supuesto también un avance decisivo para que los Métodos Electroanalíticos ocupen hoy día un lugar importante en el concierto de la metodología analítica [4].

De hecho, se han incorporado varios materiales: metales, carbono y derivados, mezclas, electrodos modificados en superficie, electrodos compósitos, bioelectrodos y un amplio repertorio de términos más o menos asumidos por el entorno científico.

3.1.2.1 Electrodo de Hg

En el pasado, el DME era el electrodo más ampliamente utilizado en voltamperometría debido a sus características únicas [5]. El mercurio, elemento metálico que se encuentra en estado líquido a temperatura ambiente, constituye uno de los materiales más apropiados para construir un electrodo de trabajo, debido a que posee un buen número de propiedades muy favorables para esta función [6]. La más importante, probablemente, sea su elevado sobrepotencial con respecto al hidrógeno, destacando también la gran uniformidad que presenta cualquier superficie de mercurio y su gran reproducibilidad, siempre que se encuentre libre de impurezas.

Los tipos que se utilizan en voltamperometría son:

- Electrodo de gotas de mercurio (DME: “Dropping Mercury Electrode”);
- Electrodo de película de mercurio (FME: “Film Mercury Electrode”);
- Electrodo de gota estática de mercurio (SMDE: “Static Mercury Drop Electrode”);
- Electrodo de gota suspendida de mercurio (HMDE: “Hanging Mercury Drop Electrode”).

Una limitación del DME es la facilidad con que el mercurio es oxidado [7]. A potenciales mayores que +0,4 V, tiene lugar la formación de Hg(I), dando una onda que se solapa con las curvas de otras especies oxidables. En presencia de iones que formen precipitados o complejos con Hg(I), este comportamiento tiene lugar incluso a potenciales más bajos, por ejemplo, en presencia de iones Cl^-.

3.1.2.2 Electrodos sólidos

El limitado intervalo anódico de los electrodos de mercurio ha promovido la utilización de otros materiales para la determinación de los compuestos oxidables. De los diferentes materiales sólidos utilizados para los electrodos de trabajo, los más utilizados son el carbono, el platino y el oro. Los electrodos sólidos pueden ser estacionarios o rotatorios, y muchas veces tienen la configuración de disco plano. Estos electrodos consisten en una barra corta del material del electrodo empotrado en un tubo de un material aislante (Teflón), ajustado por tamaño [2].

Los electrodos sólidos de disco se emplean intensamente en el análisis en flujo como detectores de capa fina (*thin-layer*) o *wall-jet*. Otras configuraciones de los electrodos sólidos, entre ellos los ultramicroelectrodos, y los electrodos de capa gruesa (screen-printed) cada vez atraen más atención.

El factor más importante en el uso de electrodos sólidos es el estado de su superficie. Para obtener resultados reproducibles se requiere realizar un tratamiento meticuloso de la superficie del electrodo que comprende tanto el pulido mecánico como el tratamiento electroquímico [2-4].

En los últimos años, ha aumentado considerablemente la investigación de la modificación de superficies de carbono tanto en la ciencia de materiales como en la electroquímica [8,9, 10]. Una de las razones, se debe a que el carbono es inerte y tiene buena conductividad, además es resistente a los ataques químicos. Esta superficie ha sido usada extensamente como sustrato soporte, especialmente en electroquímica como electrodo con una gran ventana de potencial para aplicaciones catalíticas, analíticas y biotecnológicas.

Por otra parte, los nanotubos de carbono (CNTs) representan un grupo cada vez más importante de nanomateriales debido a sus exclusivas propiedades geométricas, mecánicas, electrónicas y químicas [4]. Tales propiedades los hacen muy atractivos para su utilización en detección electroquímica. Sin embargo, la mayor dificultad para su uso en dispositivos electroquímicos es su baja solubilidad en los solventes comunes.

En esta Tesis se han utilizado electrodos de grafito (EPPG) y carbono vítreo (GCE). En este último, se procedió a la modificación de su superficie con nanotubos de carbono de pared simple (SWCNT) y pared múltiple (MWCNT). La descripción detallada de la preparación y el tratamiento de su superficie se presenta en el Capítulo 9.

3.1.3 Aplicación de la voltamperometría en los estudios de complejación

Las técnicas voltamperométricas se utilizan ampliamente para determinar la concentración de iones metálicos y también para el estudio de equilibrios en disolución. Así, las técnicas voltamperométricas se han utilizado para el estudio de equilibrios de complejación porque permiten deducir las diferentes formas en que pueden existir los metales en presencia de agentes complejantes [3, 11].

La señal voltamperométrica obtenida para el ión de metal en presencia de los agentes complejantes depende de los fenómenos que tienen lugar en 3 diferentes regiones del sistema disolución/electrodo (Figura 3.5). En el seno de la disolución, donde la mayor parte de la muestra no está afectada por el proceso electródico, siempre hay equilibrio químico.

Por tanto la concentración de cada especie es constante y verifica todas las constantes de estabilidad del sistema. En la capa de difusión (la región alrededor del electrodo de trabajo) las concentraciones de las especies están afectadas por el proceso electródico y cambian progresivamente en función del tiempo, potencial aplicado y distancia al electrodo. Este cambio de concentraciones está determinado por la velocidad con la que se consume la especie electroactiva en el electrodo, la velocidad de transporte de las especies por difusión hacia el electrodo, y las reacciones que pueden transformar una especie en otra mientras están moviéndose a lo largo de la capa de difusión. La extensión del último fenómeno está determinada por la relación entre la cinética de asociación/disociación del complejo y el tiempo de duración del experimento voltamperométrico.

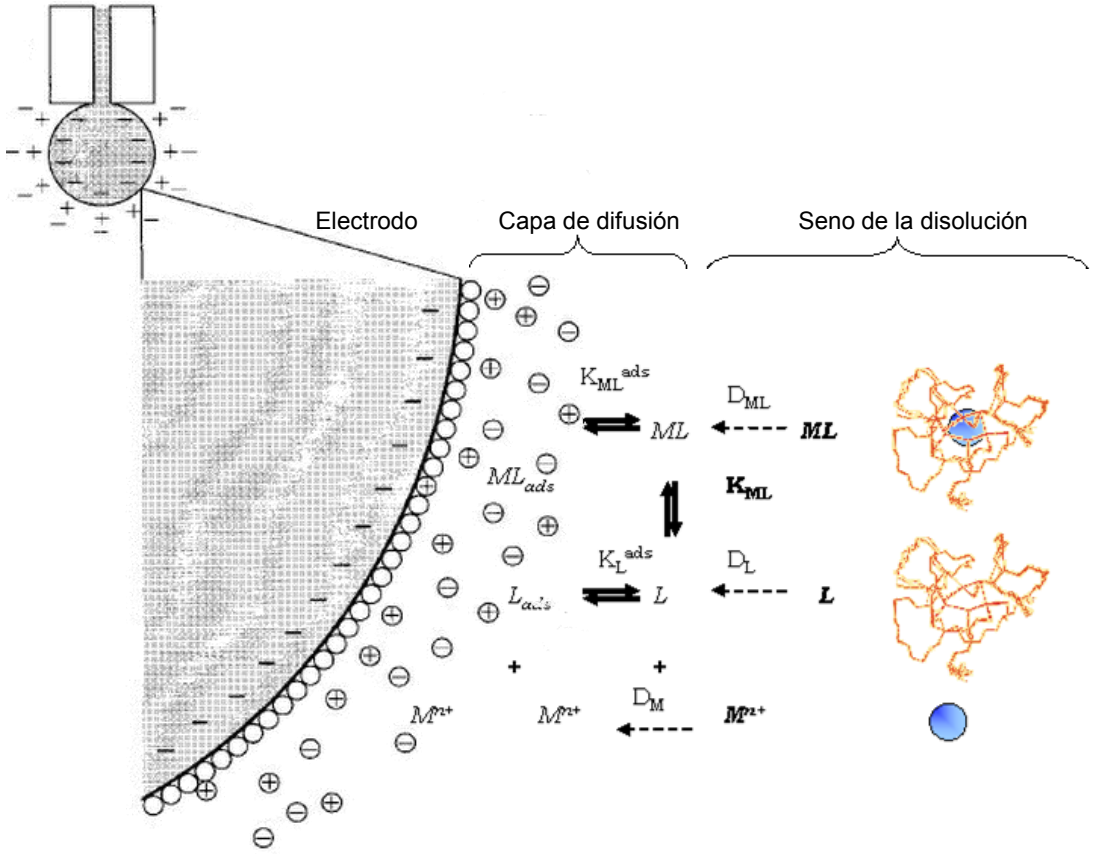


Figura 3.5 – Procesos que tienen lugar en la celda electroquímica en presencia de ión metálico y molécula complejante.

Si la cinética es más lenta que la medida, la conversión entre las especies no tiene lugar en la capa de difusión, y cada especie se transporta y reduce independientemente. En esta situación los complejos se denominan electroquímicamente inertes. Al contrario, si la cinética es más rápida que la medida, cada variación de las concentraciones de las especies se compensa por la asociación o disociación de otras. Esto significa que hay la interconversión contínua que asegura el cumplimento de todas las constantes de estabilidad a lo largo de la capa de difusión. Se produce una única señal que es el promedio

de la reducción de todas las especies metálicas. Los complejos en este caso se denominan electroquímicamente lábiles. La situación más problemática se encuentra cuando la cinética de asociación/disociación de los complejos es del mismo orden que la velocidad de medida. En este caso, los complejos no son ni totalmente lábiles ni totalmente inertes, y no está claro qué tipo de respuestas se obtienen. Otro problema es la reducción irreversible de algunos metales y/o sus complejos por la transferencia lenta de los electrones hacia la superficie del electrodo. Esto produce el desplazamiento de los picos hacia potenciales más negativos, disminución de la intensidad e incremento de la anchura del pico [12].

Una manera de afrontar el estudio de la complejación de iones metálicos mediante técnicas voltamperométricas es a través del establecimiento de modelos teóricos que consideran tanto la complejación en el seno de la disolución como los procesos que tienen lugar en la interfase. El ajuste de los datos experimentales a las ecuaciones del modelo permite el cálculo de las constantes de estabilidad de los complejos formados. Esta aproximación se conoce con el nombre de *hard-modelling* [12], y es la aproximación electroquímica clásica.

3.1.3.1 Caso de complejo inerte

El caso más sencillo es el de un metal que se reduce reversiblemente y forma complejos inertes electroinactivos (Figura 3.6). En este caso la señal de reducción del metal aparece a un potencial fijo, y la intensidad de la señal es directamente proporcional a la concentración del metal libre presente en cada momento. La variación de la altura de la señal correspondiente al metal libre (que se observaría a lo largo de una valoración) se debe a la formación de complejos sucesivos mononucleares y electroquímicamente inertes. En este caso es posible ajustar las ecuaciones de las constantes de complejación a la fracción del metal libre calculada a lo largo de la valoración [11-12]. Esta fracción se calcula como el cociente entre la intensidad del pico en presencia y ausencia del ligando. El proceso de ajuste esta basado en la resolución de una ecuación polinómica que se obtiene a partir de la combinación de las constantes de complejación medias y de los balances de masa para ligando y metal.

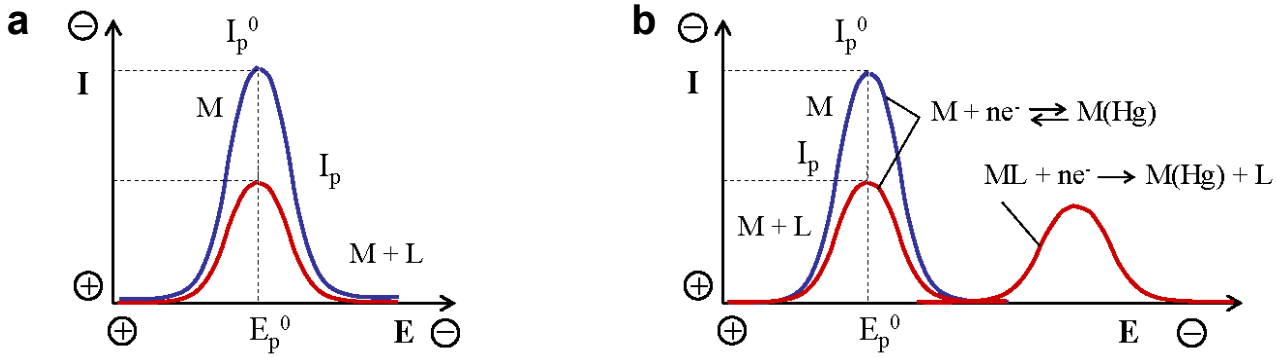


Figura 3.6 – Representación de la evolución de las señales en el caso de formación del complejo inerte electroinactivo (izquierda) y electroactivo (derecha).

En otro caso la señal de reducción del metal aparece a un potencial fijo, mientras el potencial para la reducción de un complejo metálico es más negativo que el correspondiente a la reducción del ion metálico solo. De hecho, este desplazamiento negativo en el potencial permite conocer la composición del ion complejo y determinar su constante de formación siempre que la reacción electródica sea reversible.

3.1.3.2 Caso de complejo lábil

Cuando el metal que se reduce reversiblemente forma con el ligando complejos lábiles, la única señal de reducción obtenida se va desplazando hacia los potenciales negativos a medida que aumenta la concentración de ligando. La intensidad de la señal se mantiene prácticamente constante, si el coeficiente de difusión del ligando (D_L) y del complejo formado (D_{ML}) son similares al del metal (D_M) (caso de ligandos de pequeño tamaño), o puede disminuir progresivamente, cuando el coeficiente de difusión del ligando y del complejo formado es inferior al del metal libre (caso del ligando macromolecular). En estos casos los modelos teóricos que se aplican para evaluar los parámetros de complejación son los de Lingane [13], De Ford y Hume [14] y de Jong *et al.* [15], respectivamente. El método de De Ford y Hume permite hacer los cálculos de las constantes de estabilidad a partir del desplazamiento del potencial de la señal provocado por las adiciones del ligando y de la relación de intensidad de la señal de reducción del metal en presencia del ligando y en su ausencia (que es mínima) [14].

En el caso de complejos con ligandos macromoleculares, donde se considera que se forman únicamente complejos 1:1 con cada porción complejante, se puede aplicar el modelo de de Jong *et al.* [15]. En ambos modelos para que las ecuaciones sean válidas los complejos han de ser lábiles, ha de haber exceso de ligando y ausencia de fenómenos de adsorción en el electrodo.

En muchos casos resulta imposible tener un modelo teórico que describa el sistema a priori. En estas ocasiones se puede aplicar el modelado blando (*soft-modelling*) como se ha hecho a lo largo de esta Tesis en los estudios de complejación de los metales pesados con diferentes ligandos. La descripción detallada de los métodos de *soft-modelling* se presenta en el Capítulo 3.5 y su aplicación práctica se revela en los Capítulos de resultados.

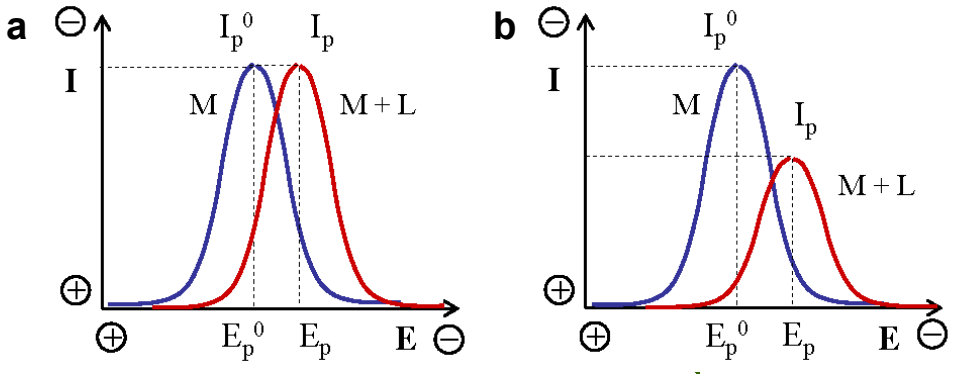


Figura 3.7 – Representación de la evolución de las señales en el caso de formación del complejo lábil sencillo (izquierda, equilibrio rápido y D_M=D_{MLi}) y lábil macromolecular (derecha, equilibrio rápido y D_M>D_{MLi}).

3.1.3.3 Efecto del pH en los voltamperogramas.

Los procesos electródicos de compuestos orgánicos implican normalmente iones hidrógeno, con la reacción típica:

$$L_{ox} + mH^+ + ne^- \rightleftharpoons L_{red}H_m \qquad (3.1)$$

por donde L y LH_n son las formas oxidada y reducida de una molécula orgánica (ligando). Por tanto, los potenciales de semionda de los compuestos orgánicos son marcadamente dependientes del pH. Además, la modificación del pH puede dar lugar a un cambio en el producto de reacción.

Debería resaltarse que un proceso electródico que consume o produce iones hidrógeno altera el pH de la disolución en la superficie del electrodo, a menudo drásticamente, a menos que la disolución esté bien tamponada. Estos cambios afectan al potencial de reducción de la reacción y provocan ondas alargadas pobremente definidas [16]. Por otra parte, cuando el proceso electródico está alterado por el pH, como en el caso del benzaldehído, no se encuentra una relación lineal corriente de difusión/ concentración. De modo que en polarografía es imprescindible tamponar adecuadamente la disolución para obtener potenciales de semionda y corrientes de difusión reproducibles. La descripción detallada de los diferentes tipos de evolución de señales en experimentos de cambio de pH se presenta en el Capítulo 3.5.

3.1.4 Determinación electroquímica de tioles

La determinación en los fluidos biológicos de las moléculas que contienen grupos tiol (Cys, GSH, HCys, etc.), tiene una importancia primordial ya que sus niveles puede indicar la presencia de diferentes desórdenes y enfermedades [17,18,19]. El análisis de estos compuestos se puede llevar a cabo oxidándolos directamente o utilizando un sistema mediador (*p.ej.*, Ferroceno), y también empleando procedimientos basados en CSV sobre los complejos metálicos de estas biomoléculas [17, 19]. En la Figura 3.8 se presenta un esquema de los principales métodos electroquímicos de determinación de tioles.

Históricamente, el mercurio ha sido el material electródico más utilizado para el análisis de tioles. La metodología está basada en la formación y acumulación del complejo metal-tiol en la superficie del electrodo:

$$Hg^0 + 2RSH \rightarrow Hg(SR)_2 + 2H^+ + 2e^- \qquad (3.2)$$

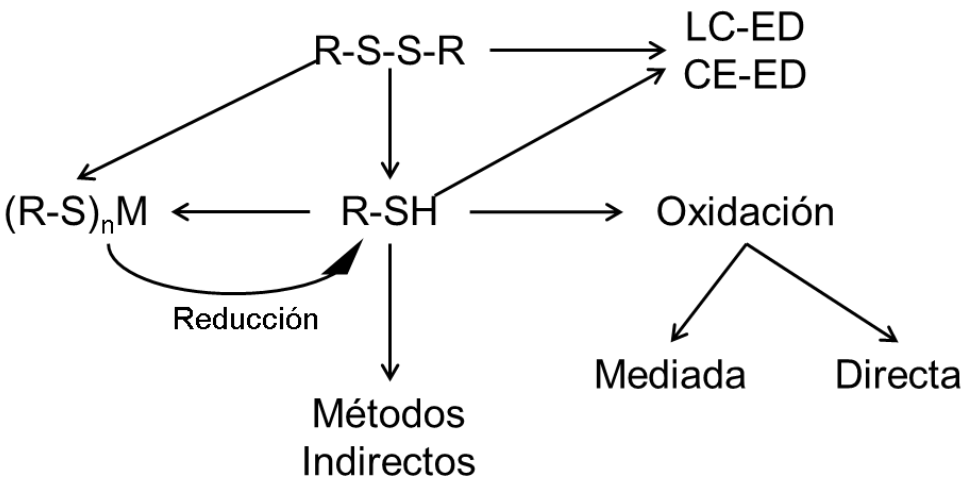


Figura 3.8 – Esquema de estrategias electroanaliticas empleadas en la determinación de tioles.

Después de un período de deposición se aplica el barrido de potencial catódico que permite la reducción del ión metálico. La intensidad del pico resultante corresponde al contenido del compuesto. Esta metodología se basa en el protocolo de la voltamperometría de redisolución catódica (CSV) y se ha utilizado mucho en el análisis de los compuestos de azufre divalente [17, 20]. Sin embargo, los iones de Cu pueden proporcionar también grandes resultados, gracias a la fuerte adsorción de los complejos de los tioles con Cu(I). Este fenómeno se ha utilizado para la determinación de las fitoquelatinas por CSV [21] en el electrodo de Hg, añadiendo iones Cu^{2+}. Otra alternativa puede ser CSV catalítica, cuando a la disolución del tiol analizado se le añaden los iones de Ni o Co, se forman sus complejos y de esta manera su reducción ocurre a potenciales más bajos que los del catión hidratado [22].

Aparte de los electrodos de Hg, se utilizan los electrodos de Au cubiertos con amalgama de Hg, electrodos de W (en este caso la señal analítica se deriva de la reducción de Hg^{2+} disuelto y enlazado en los complejos con tioles), electrodos de Pt (utilizando iones Ag^{+} en vez de Hg^{2+}) [17] y electrodos de amalgama de Cu [17, 23].

3.1.5 Electroquímica de las distintas especies de selenio

En comparación con las otras técnicas analíticas, las técnicas voltamperométricas son económicas, sensibles y selectivas, a pesar de que existen pocos métodos electroquímicos que puedan ser aplicados a la determinación de Se en fluidos corporales. Los problemas principales de los métodos electroquímicos para la determinación de Se son las interferencias, orgánicas o inorgánicas. Considerando los efectos de matriz, el método de adición estándar suele ser el preferido para la cuantificación. [24] Cuando se usan técnicas electroquímicas la adsorción de la matriz orgánica incompletamente digerida puede inhibir el proceso de electrodo y distorsionar la respuesta. [25] Por otra parte, la mineralización completa hace que la preparación de muestra sea más compleja y aumente el riesgo de pérdidas de Se.

La electroquímica del selenio en electrodos sólidos es muy compleja. En medio ácido, se proponen dos reacciones diferentes para la reducción de Se(IV), la única forma de selenio electroactiva, dependiendo del potencial aplicado [26] (reacciones 3.3 y 3.4).

$$H_2SeO_3 + 4H^+ + 4e^- \rightarrow Se + 3\ H_2O \quad (3.3)$$

$$H_2SeO_3 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow H_2Se + 3\ H_2O \quad (3.4)$$

Algunos autores proponen que la reacción 3.4 es el resultado de la reacción 3.3 seguida por una reducción posterior de Se(0) mediante la reacción 3.5 [27].

$$Se + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2Se \quad (3.5)$$

Cuando la reducción se efectúa a potenciales más positivos (típicamente entre 0 y +400 mV, dependiendo del electrodo de referencia), la reducción de Se(IV) sigue la reacción (3.3) [26]; por otro lado, cuando los potenciales son más negativos, pueden ocurrir las reacciones 3.4 y 3.5, resultando en la formación de H_2Se.

El pico del selenio puede desplazarse a un potencial más negativo en presencia de otros iones metálicos como Cu, Pb, y Cd. [25]. Aun así tales problemas pueden eliminarse utilizando un método de separación que permita la determinación más específica del elemento a un potencial similar para todas las especies. Así, después del procedimiento de digestión, el Se se separa por cromatografía de líquidos (LC) con resina de intercambio catiónico. La detección de Se(IV) en el efluente cromatográfico se realiza por ASV en un electrodo de Au tubular. La recuperación de Se(IV) es excelente y no se observan interferencias apreciables, con la excepción del Bi(III) .

Los resultados analíticos son excelentes excepto en presencia de SiO_2. Se han encontrado dificultades al aplicar voltamperometria de redisolución catódica diferencial de impulsos (DPCSV) a muestras con bajos contenidos en Se porque concentraciones elevadas de HCl (>0.15 M) interfieren con el electrolito (ácido perclórico). La reducción de As(III), Cu(II), Fe(III), Zn(II), y Pb(II) no interfiere con la reducción del seleniuro de Hg(II) cuando se aplica DPCSV.

Se ha propuesto un procedimiento para determinar Se(IV) y Se total en agua de mar que utiliza CSV en presencia de Cu añadido [28]. Las condiciones analíticas optimizadas incluyen una concentración de cobre de 40 µM y un pH de 1.6. El cadmio interfiere con la determinación de Se sólo cuando está presente en una concentración 100 veces más alta que la normal. La fotólisis UV a pH ≈ 8 suele convertir el selenio en Se(VI), que es la especie electroactiva. La respuesta es lineal para concentraciones de Se entre 0 y 200 nM. El límite de detección es 0.01 nM de Se utilizando un tiempo de deposición de 15 min.

Grier y Andrews utilizan DPCSV en un electrodo de DME para determinar 5×10^{-10} mol/L de SeCyst en medio 1 mol/L HCl [29] El método proporciona una calibración lineal hasta 0.150 g Se mL^{-1}. Aun así, en DME no se observó ninguna oxidación electroquímica. En cuanto al uso de GCE para el análisis electroquímico directo de SeCyst no se han encontrado referencias al respecto.

En otro estudio se examinó el comportamiento electroquímico de Se(IV) en electrodos sólidos de metal en diversas soluciones de electrólito [30]. Para electrodos de oro en medios ácidos (H_2SO_4 y $HClO_4$), Se(IV) exhibió dos procesos claros de deposición de una monocapa vía subpotential seguido por el crecimiento de una capa. Sin embargo, en el caso del platino sólo se observó un pico de deposición. La electrodeposición de Se(IV) en medio 0.1 M KCl sobre electrodos de oro y platino también se investigó y se encontró que ésta ocurría en ambos electrodos, si bien de forma no tan clara como en los medios ácidos. Además, en este medio tiene lugar la reducción del selenio anteriormente depositado en el electrodo para formar hidruro de selenio. Estos resultados confirmaron la importancia del uso de medios ácidos para la detección de selenio. A pesar de que los dos medios ácidos proporcionaron un comportamiento similar, había una resolución mejor en el electrólito $HClO_4$. El oro es un substrato más adecuado que el platino para la electrodeposición de selenio y, como resultado, para su electroanálisis. La presencia de cobre o plomo en la solución de medida produce un cambio de la respuesta voltamperométrica al selenio, implicando una interferencia; aun así, la adición de zinc o níquel no influyen en la respuesta del selenio. El uso de voltamperometría de redisolución anódica con barrido de onda cuadrada (SWASV) para el análisis de selenio en una serie de microelectrodos (MEA) proporciona rendimientos analíticos mejores que en un electrodo de disco, mostrando una mejor linealidad, sensibilidad y LOD (25 nM). Aun así, existen evidencias, tanto electroquímicas como visuales, para la formación de una aleación AuSe en el MEA, sugiriendo la importancia de los electrodos desechables en el análisis de trazas de selenio.

Por DPCSV el mecanismo de reacción para la determinación de Se(IV) implica la reducción de H_2SeO_3 a H_2Se durante el paso de deposición (*ca.*−200 mV) [28, 31] y en que la reacción global se describe según la reacción 3.6.

Deposición	$H_2SeO_3 + Hg + 4H^+ + 4e^- \rightarrow HgSe + 3\ H_2O$	(3.6)
Redisolución	$HgSe + 2H^+ + 2e^- \rightarrow H_2Se + Hg$	(3.7)

Se ha desarrollado un método sencillo y exacto para la separación y determinación acoplada a LC de Se(IV), Se(VI), $(CH_3)_2Se_2$, $(CH_3)_2Se$, SeMet y SeCyst basado en DPCSV sobre un electrodo de gotas de mercurio colgante (HMDE) [31]. Así, SeCyst y Se(IV) se han determinado simultáneamente en la fase acuosa que utiliza HCl como electrólito, mientras que la determinación de $(CH_3)_2Se_2$ se consigue en la fase orgánica después de extraer la muestra con diclorometano utilizando como electrólito $LiClO_4$ en etanol absoluto acidificado con HCl. No se ha observado ningún efecto significativo de la presencia de Scyst en la determinación de SeCyst, incluso a una concentración 300 veces mayor. Para la optimización del procedimiento se investigaron varios parámetros voltamperométricos, como el tiempo de deposición, voltaje, clase de electrólito y acidez de la muestra, así como la clase de extractante para la separación eficaz de las especies de selenio entre las fases acuosa y orgánica. Además, se consiguió la conversión cuantitativa del Se(VI) electroquimicalmente inactivo a Se(IV) probando diferente agentes reductores.

La actividad electroquímica de la selenocistamina (Se-CM) se atribuye a la ruptura del enlace Se–Se mediante el proceso electródico mostrado a continuación, el cual es similar al proceso que ocurre para compuestos con enlaces S–S [32]:

$$H_2NCH_2CH_2Se\text{-}SeCH_2CH_2NH_2 \rightleftharpoons (H_2NCH_2CH_2Se\text{-}SeCH_2CH_2NH_2)_{ads} \quad (3.8)$$

$$(H_2NCH_2CH_2Se\text{-}SeCH_2CH_2NH_2)_{ads} + Hg^0 \rightleftharpoons (H_2NCH_2CH_2Se\text{-}Hg\text{-}SeCH_2CH_2NH_2)_{ads} \quad (3.9)$$

$$(H_2NCH_2CH_2Se\text{-}Hg\text{-}SeCH_2CH_2NH_2)_{ads} + 2e^- \rightleftharpoons 2\ CH_2CH_2NH_2Se^- + Hg^0 \quad (3.10)$$

La detección electroquímica de selenourea (Se-U) y de Se-CM se ha estudiado en Na_2CO_3 y HCl, respectivamente, y los límites de detección obtenidos son muy bajos, en la gama de los ng, sin interferencias de compuestos típicos con estructura similar, como urea, S-urea, y S-cistamina [33]. Se ha desarrollado un procedimiento simplificado que se basa en la separación por intercambio iónico de Se-U y Se-CM, cuyos potenciales de semionda son muy próximos. Así, Se-CM permanece en el intercambiador catiónico Purolite C 100 H, mientras que Se-U se encuentra en el efluente y se determina por SWCSV utilizando Na_2CO_3 como electrólito. Se-CM se eluye entonces del intercambiador catiónico, mediante HCl 4 M, y se analiza por SWCSV en la disolución de HCl. Consiguientemente, se desarrolló un sistema de flujo para la separación y determinación electroquímica de selenio inorgánico (Se(IV) y Se(VI)) y orgánico (Se-U, Se-CM, $(CH_3)_2Se_2$ y $(CH_3)_2Se$) y se aplicó a una muestra de tierra medioambiental. Los resultados fueron comparables con aquellos obtenidos por HPLC/ICP-MS, y a los obtenidos en una muestra de orina.

La voltamperometría de impulsos diferencial (DPV) se ha utilizado para la determinación de SeCyst utilizando un electrodo de carbono modificado con película de oro-selenio ((Se-Au)/GC) [34]. En medio 0.10 mol L^{-1} KNO_3 (pH 3.20), SeCyst produce un pico de reducción a -740 mV en el electrodo (Se-Au)/GC. La intensidad de pico tiene una relación lineal con la concentración de SeCyst en el intervalo $5.0x10^{-8}$ – $7.0x10^{-4}$ mol L^{-1}, y da lugar a un límite de detección de SeCyst de $3.0x10^{-8}$ mol L^{-1}. En la literatura se describe que SeMet puede ser fácilmente convertido a selenóxido de selemetionina en presencia de agentes oxidantes, y que SeCyst puede ser oxidada a selenóxido de selenocistina por un oxidante fuerte [35]. En la referencia citada se propone el siguiente esquema para la oxidación de SeCyst y SeMet:

$$HOOCCHNH_3^+CH_2Se\text{-}SeCH_2CHNH_3^+COOH + 4H_2O \rightarrow 2HOOCCHNH_3^+CH_2SeOOH + 6H^+ + 6e^- \quad (3.11)$$

$$CH_3SeCH_2CH_2CHNH_3^+COOH + H_2O \rightarrow CH_3SeOCH_2CH_2CHNH_3^+COOH + 2H^+ + 2e^- \quad (3.12)$$

La oxidación electroquímica de SeCyst y SeMet, en un electrodo de oro se estudió por CV, con electrodo de disco rotatorio (AuRDE) y cronocoulombimetria (CC). En 0.2 mol/L HAc-NaAc (pH = 3.90) como electrólito soporte, los potenciales de pico anódico de SeCyst y SeMet son de 810 mV y 638 mV, respectivamente, y este proceso electródico está controlado por difusión [36]**.** El proceso de oxidación electroquímico de SeCyst incluye la transferencia de seis electrones y produce selenóxido de selenocistina. En el proceso de oxidación electroquímico de SeMet están implicados dos electrones y se produce selenóxido de selenometionina.

También se han utilizado monocapas autoensambladas (SAM). Las películas se prepararon por autoensamblaje de nanoparticulas de selenio (nanoSe^0) combinado con ácido ascórbico (Vc) y SeCyst (SAM nanoSe^0/Vc/SeCyst)[36, 37].

Las SAMs de SeCyst se forman sumergiendo el electrodo de Au en una solución de SeCyst (pH 1.2) a temperatura ambiente durante 32h. La superficie de SeCyst SAMs es más hidrofílica que el electrodo de Au sin modificar. El electrodo posee una respuesta iónica en presencia de $Fe(CN)_6^{4-/3-}$ como sonda iónica. La capacidad de transferencia electrónica del $Fe(CN)_6$ se mejora drásticamente, en presencia de Cu^{2+} y Pb^{2+}, en el electrodo SeCyst SAMs. Esto se debe al hecho de que la interacción entre SeCyst SAMs y Cu^{2+} (o Pb^{2+}), incluyendo la coordinación e interacción electrostática, cambia la conformación de las SAMs de SeCyst.

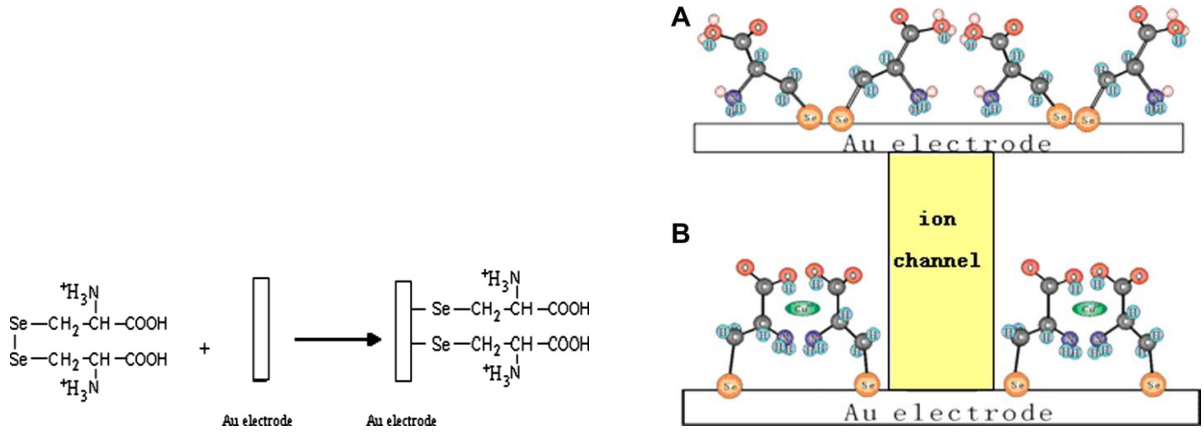


Figura 3.9 – Proceso de ensamblaje de SeCyst SAMs en el electrodo de Au a pH 1.2 (izquierda); Modelo de respuesta iónica en presencia de Cu^{2+} en el electrodo SeCyst SAMs/Au (derecha).

En base a los resultados experimentales se ha propuesto el siguiente mecanismo de respuesta de las SAM de SeCyst. En la solución de electrolito a pH 5.5 el grupo COOH se ioniza a COO^-, y el grupo NH_2 queda eléctricamente neutro. Cu^{2+} y Pb^{2+} pueden interaccionar con COO^- y $–NH_2$ por atracción electrostática, e incluso coordinarse, y todo ello disminuye la repulsión electrostática entre $Fe(CN)_6$ y COO^-, y también entre las dos cadenas de SeCyst. Esto reduce la distancia entre las dos cadenas y hace más compactas las monocapas SAM de SeCyst.

Como Cu^{2+} y Pb^{2+} pueden coordinarse con SeCyst, se observaron tanto los picos redox del complejo Cu–SeCyst como los de Cu^{2+}. Estos indicaron que existe una parte de Cu^{2+} coordinado con SeCyst en la superficie del electrodo, y otra parte que llega a la superficie del electrodo como consecuencia de una reacción redox. En comparación con las SAM de SeCyst, las de Cu– SeCyst mejoran la capacidad de tranferencia electrónica de $Fe(CN)_6$.

Cuando el Cu^{2+} se coordina con −COOH y $–NH_2$ de SeCyst, SeCyst se transforma en Cu–SeCyst en la SAM de SeCyst/Au y la estructura de SAMs cambia de planar a estructura recta. Finalmente se podría formar un canal iónico entre dos SeCyst (Figura 3.9), y otros iones como $Fe(CN)_6$ podrían pasar más fácilmente. Este mecanismo sería también aplicable para Pb^{2+}.

Un electrodo de película de Au modificado con nano SAM Se/Vc/SeCys se ha empleado para determinar SeCyst y SeMet [36]. El análisis de la superficie del electrodo mediante

técnicas de análisis de superficie (AFM y SEM) mostró la especial estructura tridimensional (3D) de la red sol-gel presente en la película. El electrodo modificado se caracterizó por espectroscopía de impedancia electroquímica (EIS) y CV. También se ha descrito la determinación por DPV de selenoaminoácidos utilizando electrodo de oro modificado con una película nano SAM Se^0/Vc/SeCys. En una solución PBS (pH 7.0) + 0.1 mol L^{-1} $NaClO_4$, los selenoaminoácidos tienen un pico de reducción a *ca.* -400 ± 50 mV. La intensidad de pico sigue una relación lineal con la concentración de selenoaminoácidos en el intervalo $5.0x10^{-8}$ – $1.0x10^{-5}$ mol L^{-1}, y un límite de detección de 1.2 $x10^{-8}$ mol L^{-1}. El contenido de selenoaminoácidos en el polvo de selenio orgánico se determinó por DPV. Los resultados mostraron 71.5 mg g^{-1} de SeCyst y 65.1 mg g^{-1} de SeMet en el polvo.

El electrodo de Au modificado con película SAM nanoSe^0/Vc/SeCys permite detectar selenoamino ácidos (SeCyst y SeMet) por DPV. Los resultados experimentales indican que este método ofrece un buen límite de detección y una buena reproducibilidad para medir determinar seleno-aminoácidos (SeCyst y SeMet).

Feroci *et al*. [38] presentan un par de estudios polarograficos de sistemas que contienen Se inorgánico y diferentes compuestos orgánicos (selenito y seleniato de sodio, SeMet y Se-U) y varios iones metálicos (Zn, Cd, Hg, Cu^{2+} y Pb^{2+}). Los experimentos que investigan las interacciones se llevaron a cabo utilizando técnicas polarograficas en disoluciones no amortiguadas. En estos trabajos se consideraron dos parámetros para seguir la formación de complejos: la intensidad de pico o limite, que es normalmente una función lineal de la concentración de especie electroactiva, y la anchura de pico a media altura, cuyo valor depende de la naturaleza de la especie activa (en este caso, el ión metálico) y de su estado en la solución.

En las disoluciones en presencia de Cu^{2+} (0.15 M $NaNO_3$), selenito, seleniato, y SeMet son electroinactivos, mientras Se-U produce una onda anódica a -0.15 V (Se-U 10^{-3} M) y +0.07 V (Se-U 10^{-4} M) para su oxidación, que se solapa con la onda para la reducción del Cu^{2+} ($E_{1/2}$ =+0.025 V). Los cationes metálicos originan complejos de solubilidad y estabilidad diferentes en presencia de aniones de selenito; concretamente un complejo soluble 1:1 con Pb^{2+} (K_f= $4.9x10^4$) y una sal poco soluble con Cu^{2+} (K_f=$3.8x10^9$). En presencia de seleniato, la polarografía no fue capaz de detectar formación de complejos con estos iones metálicos, al menos bajo las condiciones experimentales utilizadas, aunque se observó una disminución de la concentración de ión Hg^{2+}. La SeMet no reaccionó con Cd^{2+}; en presencia de Zn^{2+} se forma un complejo soluble de coordinación 1; y la concentración de Hg^{2+} disminuye en presencia de concentraciones crecientes del derivado de selenio. Por otra parte, se forma un complejo coloidal con Cu^{2+} (K_f=1.4 $x10^4$), mientras no interacciona con Pb^{2+}.

Se-U no reacciona con Zn^{2+}, pero forma un complejo con Cd^{2+} de solubilidad limitada. Finalmente, este ligando no pudo ser estudiado con Hg^{2+} debido al solapamiento de los potenciales de reducción de ambos, el ligando y el catión de metal. Los iones Pb^{2+} también muestran una afinidad pobre por la selenourea: el sistema no es estable, debido a la oxidación e hidrólisis de Se-U y a la posible precipitación de seleniuro de Pb^{2+}. En presencia de Cu^{2+}, Se-U forma un complejo. El potencial para la oxidación de Se-U y la reducción de iones Cu^{2+} origina corrientes mixtas (señales catódicas).

Los resultados confirman la existencia de interacciones en sistemas donde están presentes compuestos de Se e iones metálicos. Estas interacciones traducen en la formación de complejos o sales, solubles o poco solubles en agua. El comportamiento de cada compuesto

de Se depende mucho del ión metálico considerado. Por tanto hay que ser cuidadoso al extrapolar resultados obtenidos *in vitro* a situaciones *in vivo*, especialmente porque juegan un papel muy importante los diferentes mecanismos de acumulación y transporte de ambos reactivos *in vivo* y por las posibles reacciones redox *in vivo*: selenato/selenito [39], selenito/selenato [40]. Este aspecto resulta particularmente importante en vista del hecho que algunos de los compuestos de selenio estudiados están presentes en formulaciones antioxidantes. Las reacciones entre SeMet o aniones de selenito y los iones Cu^{2+} pueden causar deficiencias de dicho elemento. Además, la formación de productos insolubles puede representar un mecanismo de defensa de un organismo viviente frente a sustancias tóxicas (Pb^{2+}).

3.2 Dicroismo Circular

3.2.1 Aspectos generales del Dicroísmo Circular

El dicroísmo circular (CD) es una técnica de espectroscopía de absorción, basada en el cambio de configuración electrónica molecular de un estado fundamental a un estado excitado, debido a la absorción de radiación electromagnética polarizada (Figura 3.10). La teoría de CD fue desarrollada por Biot Neumann y Fresnel Snatzke [41,42]. El CD permite obtener datos estructurales de baja resolución de proteínas y péptidos en solución así como en entornos que mimetizan las membranas biológicas (detergentes, vesículas lipídicas, etcétera), los resultados pueden ser obtenidos por tanto en ambientes parecidos a aquellos en los que las proteínas de membrana residen y ejercen su función [43,44].

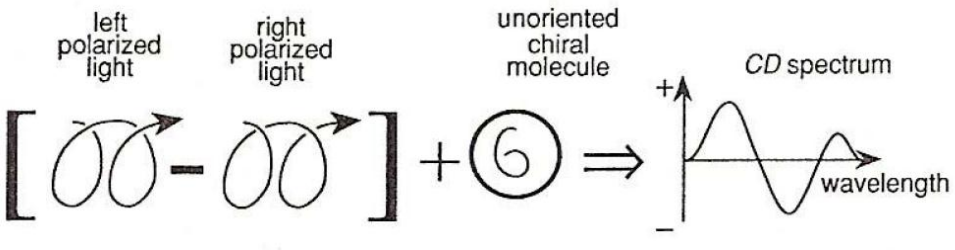


Figura 3.10 – Ilustración esquemática del dicroísmo circular.

La luz polarizada en un plano puede ser entendida como la suma de dos componentes de luz polarizada circularmente de igual magnitud, uno girando en el sentido de las agujas del reloj (dextrógiro, D) y otro, en el sentido opuesto (levógiro, L) (Figura 3.10). El vector resultante de la suma de D y L permanecerá siempre en un plano, dado que ambos componentes giran en fase. La representación de la magnitud de este vector (suma de L y D) en un plano produce una onda oscilante.

Si ambos componentes (D y L) son absorbidos con igual intensidad por un compuesto se generará una radiación polarizada en el plano original pero con una intensidad menor. Si por

el contrario se produce una absorción diferencial de estos dos componentes se producirá el efecto conocido como dicroísmo circular. En este caso la radiación resultante variará el plano de polarización con el tiempo dado que el vector resultante de la suma de D y L (ahora de magnitud diferente) ya no permanece constante. Cuando esto ocurre se dice que la luz se encuentra polarizada elípticamente (Figura 3.11).

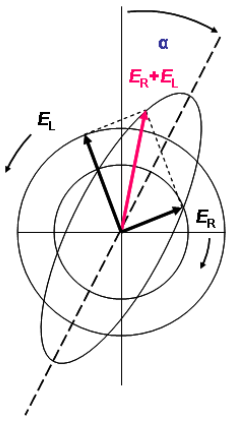


Figura 3.11 – Efecto de dicroísmo circular Cuando los dos componentes de la luz polarizada en un plano L y D tienen magnitudes diferentes, debido a la absorción diferencial de L y D por un compuesto quiral, la radiación resultante está polarizada elípticamente.

A una determinada longitud de onda:

$$\Delta A = A_L - A_D \tag{3.13}$$

Siendo ΔA la diferencia de absorción entre la luz circularmente polarizada a la izquierda (A_L) y a la derecha (A_D). Este es el valor que generalmente muestran los espectropolarímetros, aunque por motivos históricos se

suele trabajar con elipticidad molar $[\theta]$. La relación entre $[\theta]$ y ΔA es:

$$[\theta] = 3298.2\ \Delta\varepsilon \tag{3.14}$$

$\Delta\varepsilon$ procede de expresar ΔA según la ley de Lambert-Beer, es decir:

$$\Delta A = (\varepsilon L - \varepsilon D)\ cl \tag{3.15}$$

Donde ε_L y ε_D representan los coeficientes de absorción para la luz circularmente polarizada hacia la izquierda y hacia la derecha respectivamente, c es la concentración molar y l la longitud de paso en centímetros.

Entonces

$$\Delta\varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_D \tag{3.16}$$

$\Delta\varepsilon$ representa el coeficiente molar de dicroísmo circular de la muestra para una determinada longitud de onda.

El coeficiente que relaciona $\Delta\varepsilon$ con ΔA (3298.2) se obtiene al definir la elipticidad de la polarización como:

$$\tan\theta = (E_D - E_L)/(E_D + E_L) \tag{3.17}$$

E_D y E_L representa la magnitud de los vectores del campo eléctrico de la luz polarizada circularmente a derecha e izquierda respectivamente. Existen tres métodos a través de los cuales los espectropolarímetros miden el efecto del CD:

- Modulación, es el método más común, la radiación incidente se alterna constantemente entre los componente L y D mediante un modulador;
- Sustracción directa, ambos componentes (L y D) son medidos de forma separada tras atravesar la muestra;
- Elipsométrico, se mide directamente la elipticidad de la radiación transmitida.

3.2.2 Aplicaciones del dicroísmo circular

Existe un gran número de aplicaciones para el dicroísmo circular dentro del campo de la Biología Molecular y la Bioquímica, identificación de sitios de unión entre proteínas y ligandos [45], orientación de proteínas en la membrana [46], pero sin duda la mas común es la identificación de la composición en estrutura secundaria de una proteína [46] o péptido [47].

Los espectros de dicroísmo circular se obtienen generalmente en las regiones del ultravioleta cercano (250-350 nm) y lejano (180-250 nm) de la radiación electromagnética. Las señales en la región del UV cercano son extremadamente sensibles a los cambios en la conformación en una molécula. Dado que la espectroscopía de CD es una técnica de absorción electrónica, también hablamos de grupos cromóforos.

Las proteínas presentan al menos tres cromóforos de interés, la cadena lateral de los aminoácidos aromáticos (absorben entre 260 y 320 nm), los puentes disulfuro (débil absorción en torno a 260 nm) y el enlace peptídico (absorción por debajo de 240 nm). Es este último cromóforo el único presente en todas las proteínas y el más dependiente de la

estrutura secundaria. En esta región existen dos transiciones electrónicas, una débil y amplia centrada en los 220 nm y otra más intensa cerca de los 190 nm [47-48].

Una de las aplicaciones más importantes y ampliamente usadas en esta Tesis es el estudio de complejación de diversos péptidos con iones metálicos [49,50,51,52,53]. Mucho de estos ligandos, como los tioles o selenoles, exhiben un espectro de absorción con relativamente poca actividad óptica en el rango de 220-320 nm. El espectro de los ligandos en su forma no complejada exhiben una mayor actividad óptica a λ < 250 nm debido a una forma excesivamente simple o poco definida. Sin embargo, cuando se forma el enlace entre un metal con, por ejemplo, el grupo SH de una PC_n induce a transiciones de transferencia de carga metal-ligando en que se registra cambios drásticos en reorganización de la molécula y actividad óptica [53,54]. Estos cambios en el espectro han permitido estimar estequiometrias de los complejos formados entre una variedad de iones metálicos (*e.g.* Cd^{2+}, Pb^{2+}, Hg^{2+}) con una diversidad de tioles [49, 53-55,56] como la metionina [53] o PC_n [54,55].

3.3 Espectrometría de Masas

La espectrometría de masas (MS) da nombre a un conjunto de técnicas utilizadas para la medida de la masa de los iones y su abundancia en la fase gaseosa. Este conjunto de técnicas es uno de los más versátiles e importantes en Química Analítica [57,58,59,60]. Las técnicas de masas son capaces de suministrar información sobre la composición cualitativa y cuantitativa de analitos orgánicos e inorgánicos en muestras complejas, la estructura molecular, las relaciones isotópicas de los átomos en las muestras, y la estructura y composición de superficies. Las etapas de una medida en MS son:

- generación de moléculas en fase gaseosa;
- ionización;
- separación en función de su relación masa /carga, (m/z);
- detección de los picos de los iones.

Las tres partes básicas de un detector de espectrometría de masas son la fuente de ionización, el analizador o filtro de masas y el transductor o detector (Figura 3.12). La muestra puede introducirse tanto en fase gaseosa como en fase líquida o sólida (siempre que los líquidos se evaporen o se sublimen los sólidos). La zona donde se introducen las moléculas, se evaporan, se ionizan y se aceleran se llama fuente de ionización. La muestra gaseosa se ioniza entre dos placas cargadas, donde las moléculas se rompen en fragmentos, algunos de los cuales están cargados (iones) y otros no. Los iones se aceleran por aplicación de un potencial eléctrico y se enfocan utilizando campos eléctricos y rendijas. Los iones acelerados pasan desde la fuente de ionización a uno de los numerosos tipos posibles de analizadores de masas. En la mayoría de los analizadores de masas los iones se separan en función de su relación m/z,. Esta pequeña corriente de iones se amplifica mediante el transductor, normalmente un multiplicador de electrones, que amplifica las corrientes de modo similar a un tubo fotomultiplicador [57,61].

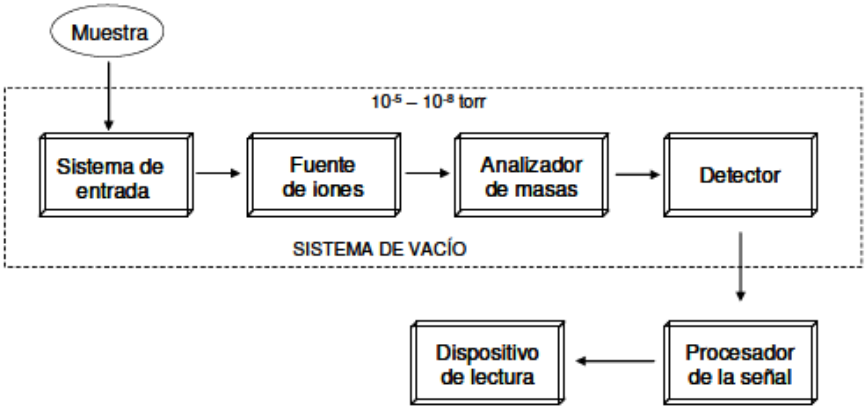


Figura 3.12 – Componentes básicos de un espectrómetro de masas.

El espectro de masas muestra la cantidad de iones detectados a valores crecientes de la relación m/z. Cada pico del espectro da información sobre la masa molecular de un determinado fragmento de la molécula que lo originó. El fragmento de mayor tamaño suele ser la molécula sin fraccionar con pérdida de un electrón, M^+, con la adición de un protón, $[M+H]^+$, u otro fragmento. Del espectro de masas se deducen de forma inmediata el peso molecular del analito, M, y los pesos moleculares de los sustituyentes y de otras partes de la molécula. Los métodos de ionización son los siguientes:

- Atmospheric Pressure Chemical Ionisation (APCI);
- Chemical Ionization (CI);
- Electron Impact (EI);
- Fast Atom Bombardment (FAB);
- Field Desorption/ Field Ionisation (FD/ FI);
- Matrix Assisted Laser Desorption Ionization (MALDI);
- Thermospray Ionization (TSP);
- Electrospray Ionization (ESI).

La mayor parte de los análisis bioquímicos utilizan como métodos de ionización ESI o bien MALDI. En la Tesis se ha utilizado el modo ESI, que se describe a continuación.

3.3.1 Ionización por electronebulización (ESI)

Es una técnica de ionización mucho menos agresiva que la EI y CI. En electronebulización se forman pequeñas gotas con carga eléctrica a partir de una disolución que fluye a través de una aguja hueca sometida a un campo eléctrico de 5 – 10 kV cm^{-1}. La aguja tiene dos flujos concéntricos, el interior que lleva la muestra y el exterior que lleva un gas que ayuda a

la formación del aerosol. Las gotas que tienen carga neta son atraídas hacia un electrodo a través del espacio abierto de la cámara de nebulización. En la cámara las gotas se mueven en contra del gas de secado (ver Figigura 3.13) y se evapora parte del disolvente. Como consecuencia de este proceso, el volumen de las gotas disminuye y los iones que se encuentran en la superficie se ven forzados a acumularse entre sí. En un momento dado, la repulsión de los iones se hace mayor que la tensión superficial que mantiene unidas a las gotas y éstas se rompen. De estas gotas se generan los iones en fase gaseosa. Los iones son atraídos hacia el orificio de entrada del analizador de masas mediante un segundo campo eléctrico. Dependiendo de la polaridad de este campo, en el analizador de masas entran sólo los aniones (operación en modo negativo) o sólo los cationes (operación en modo positivo).

El proceso de generación de los iones y de evaporación del disolvente son reacciones superficiales, y cualquier cambio sobre la superficie va a influir en el proceso. La fuente de ionización por electronebulización puede producir iones con carga múltiple, lo cual permite el análisis de compuestos de elevado peso molecular. Dos características importantes de la ESI son la generación de iones en fase gas en la misma forma en que se encuentran inicialmente en disolución, y la relativa facilidad para impedir la entrada de grandes cantidades de disolvente en el analizador de masas. Por esta última razón, esta es una fuente muy utilizada en los acoplamientos HPLC-MS. ESI se considera como un método "suave" de ionización porque la muestra se ioniza mediante la adición o la expulsión del protón. Debido a ello queda muy poca energía extra para provocar la disociación o la fragmentación de los iones de la muestra [62].

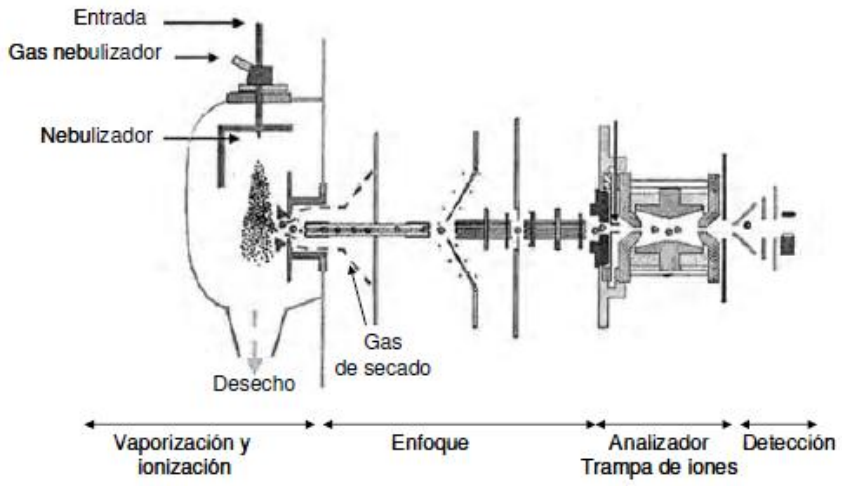


Figura 3.13 – Esquema de un espectrómetro de masas con fuente de ionización por electrospray.

3.3.2. Analizadores de masas

La función de los analizadores de masas es la de separar iones con diferentes relaciones m/z [61]. Existen diferentes tipos de analizadores. El poder de resolución del espectrómetro

de masas va a depender principalmente de las prestaciones del analizador de masas. Los principales analizadores son [62]:

- Analizadores de sector magnético;
- Analizadores de doble sector magnético o doble enfoque;
- Filtro de masas cuadrupolar;
- Trampa de iones cuadrupolar;
- Tiempo de vuelo (TOF).

El analizador utilizado en el presente estudio ha sido del tipo tiempo-de-vuelo (Time-Of-Flight, TOF). La característica más importante de un TOF es su elevada exactitud, ya que permite establecer masas con errores del orden de pocas partes por millón. Después de la etapa de ionización los iones de la muestra pasan al analizador, concretamente a un tubo de desplazamiento de un metro de longitud que separa las masas sin aplicación de ningún campo. Un impulso electromagnético comunica una determinada cantidad de energía cinética a un paquete de iones para realizar el recorrido por el tubo. Debido a que todos los iones tienen idealmente la misma energía cinética, los iones con distintas masas adquirirán distintas velocidades y por lo tanto llegarán al detector con diferentes "tiempos de vuelo" (Figura 3.14)

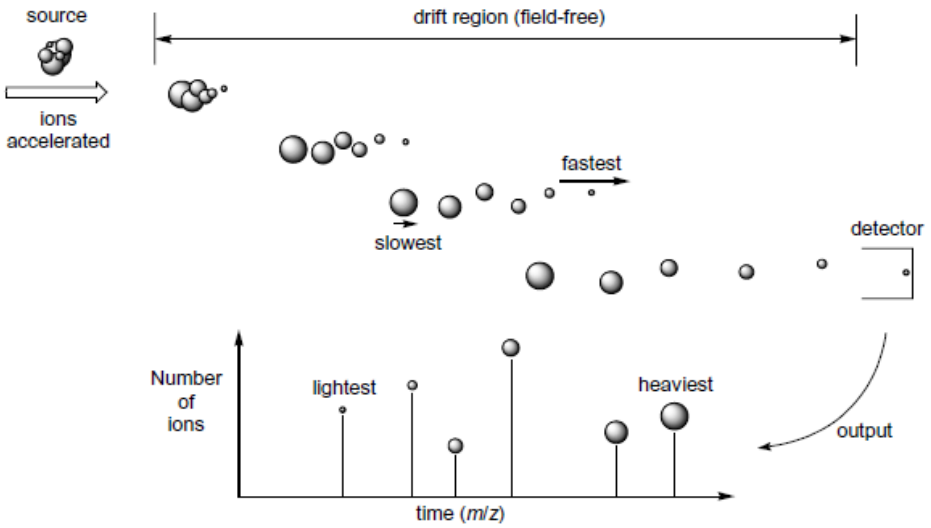


Figura 3.14 – Los fundamentos del TOF. Un pulso de iones se forma y es acelerado de la fuente para la región de deriva (que está libre de campos eléctricos o magnéticos). Los iones se separan a lo largo de la región de deriva según su valor m/z. Los iones con el valor m/z más pequeño (demovimiento más rápido) llegan primero al detector, seguidos por los iones de m/z más elevado. El detector cuenta con los iones y esta información en función del tiempo de llegada genera un espectro de masas (abajo).

Los iones más ligeros llegarán al detector (aproximadamente 30 μs) antes que los más pesados. La velocidad del ión se puede expresar según la fórmula:

$$v^2 = 2zV/m \qquad (3.18)$$

$$v = (2zV/m)^{1/2} \qquad (3.19)$$

Teniendo en cuenta que v = L/t, donde L es la longitud del tubo de flujo, se puede derivar la expresión para el tiempo de vuelo:

$$t = L\,(2zV/m)^{1/2} \qquad (3.20)$$

3.3.3 Aplicación de ESI-MS en los estudios de especiación

Se han aplicado un gran número de técnicas analíticas en estudios de especiación que tienen como objetivo la determinación de las diferentes formas químicas de los elementos. La MS ha sido muy empleada en este campo. El acoplamiento de las técnicas de separación a la MS aporta un valor añadido a la utilización de MS para la especiación, mejorando la calidad de los espectros obtenidos. Se ha comprobado empíricamente que los iones detectados en ESI-MS son aquellos presentes en la disolución inicial, o bien los iones resultantes de las reacciones de reducción en fase gas, como se ha comprobado mediante técnicas alternativas (NMR, electroquímica, etc.) [63,64,65,66]. Este es el punto crucial que define el potencial de ESI-MS para los estudios de especiación, preservando la información de la disolución inicial, que es transferida al estado gaseoso. No obstante, en algunos casos los iones pueden experimentar modificaciones significativas durante este proceso, desde la pérdida del ligando hasta la fragmentación de las moléculas. El diseño esmerado del experimento, tomando en consideración todos los parámetros que puedan afectar el estado final de las moléculas estudiadas, proporciona resultados muy satisfactorios [64,65].

Obviamente, la MS no es capaz de proporcionar una imagen 3D del complejo formado en disolución, pero las preguntas planteadas antes se pueden responder mediante ESI-MS. Por ejemplo, si se lleva a cabo un experimento con un ligando competitivo, se puede determinar la estabilidad del complejo a nivel semicuantitativo. En estas condiciones la abundancia del complejo estudiado depende del valor de su constante de estabilidad respecto a la constante del complejo con un ligando competitivo [66].

La estabilidad del complejo en fase gas puede ayudar a dilucidar la naturaleza de las interacciones implicadas en su formación en disolución. Los complejos basados en las interacciones electroestáticas muestran una estabilidad elevada en la fase gas. Por eso, estas especies no se disocian y dan señal en el espectro MS. En cambio, las interacciones hidrofóbicas son más débiles y conducen a la disociación del complejo y a la pérdida, parcial o total, de la especie. Por ello, el éxito de ESI-MS depende de la naturaleza de la interacción no covalente [66]. ESI-MS ha sido utilizada también para la caracterización de las agregaciones supramoleculares que, gracias a su naturaleza macromolecular y a su carga elevada, son perfectamente adaptables a ESI-MS [64].

3.4 Técnicas Calorimétricas

Las técnicas calorimétricas son técnicas para el análisis termodinámico. Al destacarse como una rama de la Química Física, la Termodinámica se convirtió en la disciplina que describe el estado y la transformación de la materia, y proporciona la información sobre la dirección de la evolución de los sistemas físico-químicos.

La descripción más simple de entropía (S) es la medida del desorden del sistema. Es decir, la evolución del sistema está dirigida hacia el máximo desorden (la organización más accesible), $\Delta S \geq 0$. De esta manera, si el cambio de entropía de un sistema cerrado es cero, el proceso es reversible, y tal sistema estará en equilibrio. Si la entropía total es superior a cero, el proceso que ocurre muchas veces se refiere como espontáneo o natural. Si, en cambio, el incremento de entropía es negativo, el proceso no puede proceder por lo cual se dice que no es espontáneo. La segunda ley de la Termodinámica proporciona un método importante para predecir la espontaneidad y la reversibilidad del proceso [67, 68]. En otros términos, la espontaneidad del proceso se determina por el mínimo de la energía libre de Gibbs:

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (3.21)$$

Si ΔG es negativo, el proceso será espontáneo, y vendrá determinado por la liberación de calor (proceso exotérmico). En este punto se debe considerar el término ΔH, incluido en la ecuación 3.21, que es la entalpía del proceso que determina el grado de desorden del medio ambiente. Si el proceso es exotérmico (ΔH negativo), se libera el calor que provoca mayor desorden fuera del sistema. El aumento de la entropía del medio ambiente es proporcional a la temperatura y se determina como $-\Delta H/T$.

Como se ha mencionado anteriormente, si ΔG es negativo, el proceso puede tener lugar en dichas condiciones y llevar el sistema al estado de equilibrio. Dependiendo de las condiciones ambientales, el sistema puede tener múltiples estados de equilibrio. La Termodinámica básicamente trabaja con los estados de equilibrio, motivo por el cual muchas veces al decir “Termodinámica” se comprende “Termodinámica del equilibrio”. A pesar de que los procesos biológicos no transcurren en estas condiciones, las leyes termodinámicas se usan extensamente en Bioquímica. Una de las aplicaciones más importantes de la Termodinámica es la determinación de la afinidad del enlace químico, que puede ser determinada en función de la energía libre de Gibbs estándar entre los estados libre y enlazado o en función de la constante de equilibrio (K):

$$\Delta G^0 = -RT \ln K \qquad (3.22)$$

Los métodos espectroscópicos proporcionan el valor de la constante de equilibrio (la energía libre de enlace). La valoración isotérmica calorimétrica (ITC), técnica aplicada en esta Tesis, proporciona la entalpía, la energía libre de Gibbs y, por consiguiente, la entropía relacionadas con el enlace [69,70]. Todos estos parámetros son esenciales para interpretar

los procesos a nivel molecular. Los efectos de ΔH y de ΔS sobre la energía libre de Gibbs están interrelacionados y se pueden comparar directamente. En este punto se debe considerar la omnipresente relación inversa entre la entalpía y la entropía del proceso.

3.4.1 La compensación entre entalpía y entropía

El concepto base de esta interrelación está en que la reducción de movilidad implica la reducción de la entropía. Si dos unidades se enlazan, la formación de dicho enlace (que corresponde a un incremento negativo de la entalpía) estará acompañada de la restricción de las movilidades de las dos unidades en el compuesto resultante (lo que corresponde a la contribución no favorable negativa en la entropía). Esta relación se conoce como la compensación entálpica - entrópica y es una característica fundamental de las interacciones no covalentes. En otras palabras, el enlace es opuesto a la movilidad y, recíprocamente, la movilidad es opuesta al enlace [71].

Aunque, muchas técnicas analíticas dan la posibilidad de determinar la estabilidad de los complejos formados, es decir, la constante de asociación, también es posible calcular los parámetros termodinámicos, ΔH y ΔS, mediante el análisis de van't Hoff [68], según la fórmula (3.23)

$$R \ln K = -\Delta H^\circ (1/T) + \Delta S^\circ \qquad (3.23)$$

Ahora bien, estos últimos son métodos muy laboriosos y llenos de imprecisiones ya que por razones técnicas los experimentos deben realizarse en intervalos de temperatura limitados y el error experimental se traduce en un error aun mayor en los valores de entalpía y entropía. Además, con cierta frecuencia, el valor de la constante de asociación resulta invariable en el intervalo de temperatura accesible debido a fenómenos de compensación entálpica – entrópica [72]. ITC tiene una ventaja importante ya que simultáneamente proporciona los valores de la constante de estabilidad y de la entalpía del enlace.

3.4.2 Valoración isotérmica calorimétrica (ITC)

En su origen, esta técnica se ha utilizado para cuantificar interacciones en sistemas bioquímicos [69,70] pero, debido a la gran sensibilidad que presenta, su uso se ha ido extendiendo a diferentes campos del análisis químico y el reconocimiento molecular. Su utilización en esta tesis ha sido de gran utilidad como se verá más adelante.

Este método se basa en la medición directa de la variación de calor producida en la formación de un complejo a temperatura constante. A partir de la medición del calor, al ser un parámetro que varía con el grado de formación de un complejo, es posible calcular la constante de asociación y la estequiometría del complejo. A continuación se presentan los fundamentos de su funcionamiento, así como el tratamiento matemático necesario para ajustar los datos obtenidos en una valoración.

El cambio de la entalpía que se obtiene durante la valoración de ITC es una propiedad global del sistema. Es el calor total absorbido o emitido durante el curso de la reacción (tras cada inyección del ligando). Este calor total contiene las contribuciones de los efectos no específicos tales como: el calor de dilución del ligando en la disolución amortiguadora, el calor causado por la diferencia de temperaturas de la disolución en la celda y la punta de la jeringa-inyector, y también efectos térmicos de la mezcla de las disoluciones amortiguadoras de diferentes composiciones químicas. Por eso, el cambio molar de la entalpía es la cantidad aparente (ΔH_{app}) que solamente depende del estado inicial y final de la interacción, de las moléculas libres solvatadas y del complejo final solvatado. La reorganización del disolvente afecta a ΔHapp y ΔG, como se ha comentado antes [73].

Entre las muchas posibles contribuciones a ΔH_{app} hace falta considerar más detalladamente el efecto del cambio de estado de protonación, dado que el número de los protones n_{H+} implicados en la interacción se puede determinar mediante ITC. Si la interacción incluye el cambio de estado de protonación de L y/o M, los protones se intercambian con el medio, con lo cual ΔH_{app} observada calorimétricamente depende de la entalpía de ionización de la disolución amortiguadora, ΔH_{buffer} [70, 72]. Repitiendo el experimento al mismo valor de pH, en disoluciones amortiguadoras de diferente ΔH_{buffer}, se puede calcular la entalpía de la interacción ΔH_{bind} mediante la ecuación:

$$\Delta H_{app} = \Delta H_{bind} + n_{H+} \times \Delta H_{buffer} \qquad (3.24)$$

Los valores de ΔH_{buffer} están prácticamente determinados y tabulados para todas las disoluciones amortiguadoras [74]. Se puede hacer el gráfico de la dependencia del valor de ΔH_{app}, obtenido en cada valoración en diferentes disoluciones amortiguadoras, respecto al valor de la constante de protonación del sistema amortiguador. El número de protones corresponde a la pendiente, y el valor de la entalpía de la interacción, ΔH_{bind}, corresponde al valor de intersección con el eje ΔH_{app}.

Aparte de la técnica de ITC, la entalpía del enlace se puede medir mediante el método de van't Hoff. La entalpía de van't Hoff se deriva a partir de la dependencia de K_a respecto a la temperatura, que se puede obtener mediante la misma valoración calorimétrica o las técnicas espectroscópicas. Debido a ello, se admite que los valores de entalpía obtenidos usando dos métodos diferentes pueden coincidir sólo en el caso que la reacción proceda entre dos estados: las moléculas libres y las moléculas enlazadas. En el caso contrario, se detectan las discrepancias entre las dos entalpías que se explican por la presencia de algunos efectos secundarios como, por ejemplo, la reorganización del disolvente, la protonación o los cambios de conformación de los reactivos. En este caso, la entalpía de van't Hoff es la intrínseca de la interacción de complejación, mientras que la obtenida mediante la valoración calorimétrica incluye todas las interferencias secundarias, lo que requiere un mejor conocimiento de la termodinámica de disolución [75].

La variación de entropía de asociación se puede calcular a partir de los valores de ΔG, ΔH y ΔC_p según las leyes de la termodinámica. El incremento de entropía del complejo, comparando con las moléculas no enlazadas, está causado principalmente por el efecto de hidratación; también la superficie accesible para las moléculas del agua se reduce mucho después de la complejación. Debido a ello, cuando se forma el complejo, el cambio de entropía total es, prácticamente siempre, grande y positivo. Otra contribución importante que

no favorece a ΔS resulta de la reducción de movilidad alrededor de los sitios de interacción después de la complejación. Es necesario añadir también el factor estadístico al cambio de entropía relacionado con la reducción del número de moléculas y sus grados de libertad en el complejo. El incremento positivo de entropía indica claramente que las moléculas de disolvente se han expulsado de la interfase de interacción tras la formación del complejo [72].

3.4.3 Aplicaciones de ITC en estudios de complejación

La cantidad de procesos genéticos y metabólicos que funcionan gracias a la presencia de los iones metálicos en organismos vivos es apreciable. Las interacciones de estas sustancias con los iones metálicos están bajo control de los principios químicos fundamentales, los cuales proporcionan los mecanismos para llevar el metal correcto al receptor adecuado, a la concentración y en el momento apropiados. Las técnicas calorimétricas (ITC y Differential Scanning Calorimetry, DSC) desempeñan un papel importante en los estudios de dichos mecanismos, proporcionando la información termodinámica y cinética sobre las vías de homeostasis y detoxificación de los metales en los organismos. En particular, DSC revela la información acerca de las contribuciones de los metales a la estabilidad de las proteínas, mientras que ITC cuantifica las interacciones de complejación desde la perspectiva termodinámica.

Hasta ahora se han publicado una multitud de trabajos dedicados al enlace de los iones metálicos, tanto esenciales como tóxicos, con diferentes clases de moléculas biológicas. Los estudios, en general, comprenden la obtención de los datos termodinámicos, con un análisis detallado posterior y la detección de los grupos funcionales responsables de la complejación. Muy frecuentemente el análisis del enlace de un metal con una sustancia despierta el interés acerca del comportamiento de la sustancia estudiada respecto a otro metal, lo que da motivo para realizar el estudio de la competitividad [76]. En muchas metaloproteínas la inclusión del ión metálico es un factor clave que determina la actividad de las enzimas (los iones metálicos son cofactores en este caso) o la conformación de la proteína (muchas proteínas no poseen una estructura regular sin la estabilización proporcionada por un ión metálico). El uso de ITC para el estudio de la complejación de este tipo de proteínas con los iones metálicos (como, por ejemplo, de anhidrasa carbónica y el péptido “zinc finger” con los iones de Zn^{2+}, Co^{2+} y Cu^{2+}) ha contribuido considerablemente a la comprensión de su estructura y funcionamiento [75, 77]. Así se han estudiado las interacciones de Cd^{2+} con tiorredoxina de *Escherichia Coli* [78], las interacciones de Cd^{2+} y Pb^{2+} con metalotioneína (en su apoforma) y con metalotioneínas de Zn^{2+} [79], y las interacciones de As^{3+} con diferentes moléculas con grupos tiol (entre ellas glutatión, DMSA, *etc*.) [80].

3.5 Métodos Quimiométricos

Una gran parte de la tesis se centra en la aplicación de técnicas quimiométricas de análisis multivariante a datos obtenidos mediante técnicas electroanalíticas. Con estas técnicas se intenta reconocer el modelo de especiación (conjunto de especies que coexisten) exclusivamente a partir de la evolución de los datos, sin necesidad de presuponer un modelo y comprobar su validez. Esta aproximación se suele denominar *soft modelling* y tiene especial interés en aquellas situaciones en que se obtienen numerosas señales solapadas que varían en número, forma y altura relativa a lo largo del experimento. Este comportamiento suele observarse en el estudio de moléculas de origen bioquímico, como péptidos y proteínas.

La Quimiometría se puede aplicar a los datos electroanalíticos en diferentes etapas del proceso analítico y con diversas finalidades como:

- diseño y optimización de experimentos;
- preparación y transformación de datos (para el tratamiento subsiguiente);
- clasificación de muestras;
- determinación de concentraciones, calibración e identificación de modelos (en particular, obtención de modelos para los sistemas dinámicos multicomponente).

Los datos voltamperométricos son los destinatarios principales de los métodos quimiométricos aplicados en electroanálisis debido a la posibilidad de analizar varios componentes simultáneamente [81]. Entre todos los diversos métodos desarrollados uno de los más potentes es MCR-ALS (la Resolución Multivariante de Curvas con optimización mediante Mínimos Cuadrados Alternados) [82]. MCR-ALS ha sido el método más ampliamente utilizado en la realización de la presente Tesis. Su descripción detallada, presentada a continuación, requiere la introducción previa al concepto de modelado en electroanálisis y los fundamentos de los métodos multivariantes.

3.5.1 *Hard-modelling* y *soft-modelling*

El conocimiento electroanalítico detallado de un determinado proceso engloba:

- el conocimiento y la formulación de los modelos físico-químicos de los procesos electroquímicos y de los procesos de transporte correspondientes;
- las soluciones matemáticas (analíticas o numéricas) de estas formulaciones matemáticas (derivadas según el modelo apropiado) y, en el mejor de los casos;
- la interpretación físico-química de los datos electroanalíticos.

Esta aproximación rigurosa se conoce como *hard-modelling* (modelado duro o rígido) y se utiliza muy ampliamente en la investigación electroquímica [11]. Son ejemplos de esta aproximación los modelos (y ecuaciones) de De Ford - Hume [14] y de Jong *et al.*[15].

Para obtener información de un sistema se requiere, en primer lugar, un diseño de los experimentos que permita agrupar los resultados en forma matricial. El caso habitual es la realización de medidas por DPV de una solución de metal sobre la cual se realizan

adiciones sucesivas de ligando o viceversa. Posteriormente, mediante la aplicación de una serie de técnicas de análisis factorial, se pueden obtener los perfiles de concentración de las diferentes especies formadas y de las señales individuales correspondientes.

La relación entre la concentración del analito (especie electroactiva) y la señal voltamperométrica no suele ser directa, como sucede en el caso de los datos espectroscópicos. Para revelar esta relación el modelado duro postula el modelo teórico considerando tanto los procesos de complejación en el seno de la disolución, como los procesos que ocurren en la capa de difusión en la superficie del electrodo. La solución matemática de dichos modelos de procesos proporciona las ecuaciones que contienen la serie de parámetros, las constantes de estabilidad, *etc*. No obstante, en muchos casos la formulación de un modelo teórico resulta difícil, debido a la naturaleza complicada de los procesos electródicos, de los de complejación, o de ambos [11].

En estos casos se propone un punto de vista alternativo al *hard-modelling* que incluye la identificación del modelo a partir de los datos numéricos y del análisis estadístico de los datos experimentales, en vez del ajuste de aquellos a un modelo teórico externo propuesto previamente. Por su carácter opuesto esta aproximación se denomina *soft-modelling* (modelado blando o flexible) [11, 83]. Y es aquí donde son necesarias las herramientas quimiométricas. El *soft-modelling* está basado en el uso de varios métodos computacionales y estadísticos con la finalidad de aislar las fuentes de variación en los datos experimentales. Es importante trabajar en el contexto del conocimiento previo que se tenga de los sistemas a estudio, pero por igual es esencial no estar bloqueado o cerrado en el marco de las teorías, los modelos, las expectativas construidas *a priori*. Los datos hablan por sí mismos si se manejan de forma adecuada y rigurosa.

En el caso general, el punto de partida del análisis de los datos voltamperométricos es la organización de éstos en una matriz de intensidades **I**(*nR*, *nC*) que contiene *nR* filas que corresponden al número de voltamperogramas registrados, y *nC* columnas, que corresponden a los barridos de potencial (conjunto de potenciales a los cuales se mide el valor de la intensidad). A continuación, el objetivo general de todo tipo de análisis multivariante consiste en la descomposición matemática de la matriz de intensidades **I** en el producto de dos matrices ortogonales que incluyen la información de concentraciones (**C**) y de voltamperogramas individuales (**V**). Esta descomposición se expresa según la fórmula siguiente:

$$\mathbf{I} = \mathbf{C}\mathbf{V}^{\mathbf{T}} + \mathbf{R} \qquad (3.25)$$

T indica que la matriz **V** se obtiene en la forma traspuesta, y la matriz **R** es la matriz de residuales que contiene la varianza no explicada por **C** y $\mathbf{V}^{\mathbf{T}}$ [11].

En función de las características matemáticas de la descomposición de la matriz **I,** y del algoritmo aplicado, se pueden definir diversos métodos de calibración multivariante (MLR, regresión lineal múltiple; PCR, regresión en componentes principales; CLS, mínimos cuadrados en forma clásica; PLS, mínimos cuadrados parciales, *etc.*) [84].

La mayor ventaja del método MCR-ALS respecto a otros métodos de análisis multivariante, como PCR y PLS, consiste en la posibilidad de descomposición de la matriz de datos en el producto de matrices que incluyen los perfiles de concentraciones y los voltamperogramas

individuales. De la primera matriz se identifica la evolución de las diferentes especies a lo largo del experimento (una valoración) y las estequiometrías; la segunda matriz proporciona la información sobre las características del proceso electroquímico. El análisis de las dos matrices en conjunto facilita el esquema dinámico del proceso y el modelo de complejación con la información de la especiación [11].

3.5.2 Resolución Multivariante de Curvas con optimización mediante mínimos cuadrados alternados, MCR-ALS

El método de análisis multivariante MCR-ALS ha sido desarrollada por Tauler *et al*. [85, 86] para el análisis de datos generalmente espectroscópicos. Este método ha resultado ser una herramienta muy potente en la resolución de espectros. Esto ha promovido su adaptación al análisis de los datos voltamperométricos que tienen sus peculiaridades debido a las características de los procesos electroquímicos (que tienen lugar en una interfase) respecto a los espectroscópicos (que tienen lugar en el seno de la disolución). Probablemente, la diferencia más importante entre los datos espectroscópicos y los electroquímicos se halla en el concepto del componente. Mientras en espectroscopia el componente está relacionado directamente con la especie involucrada en el proceso, en electroquímica este concepto se asocia con un evento electroquímico (que puede ser la oxidación, la reducción, la carga de doble capa, *etc*.) [11, 82]. La aplicación de MCR-ALS a los datos experimentales requiere un diseño previo del experimento, que debe ser realizado de manera muy escrupulosa. Se deben tener en cuenta las siguientes condiciones:

- las intensidades se deben medir a intervalos idénticos de potencial, es decir, siempre a los mismos potenciales;
- las intensidades tienen que depender linealmente de las concentraciones de las especies electroactivas presentes en el sistema [11, 82, 87].

Como primer paso, los datos obtenidos, ya organizados en forma de matriz **I,** se someten a una preparación previa, como la substracción de la intensidad base (de ruido) (se obtiene el voltamperograma de la disolución amortiguadora que no contiene los componentes estudiados y se substrae de los restantes voltamperogramas). Este procedimiento puede garantizar que la capacitancia de la doble capa del electrodo prácticamente no cambia en presencia de los compuestos estudiados.

En caso necesario las señales experimentales que tienen la forma sigmoidal (las que se obtienen mediante NPP o RPP) se convierten en las correspondientes señales en forma de pico, realizando la derivación. Se ha demostrado que la mejor calidad de tratamiento por MCR-ALS se consigue trabajando con las señales en forma de pico [82].

Si se requiere, el suavizado de las señales se realiza normalmente mediante el filtro de Savitzki-Golay, que se basa en el cálculo de una regresión polinomial local (de grado k), con al menos k+1 puntos equiespaciados, para determinar el nuevo valor de cada punto. El resultado será una función similar a los datos de entrada, pero suavizada. Se describen métodos para calcular desde la primera a la quinta derivada. La principal ventaja de esta aproximación es que tiende a preservar las características de la distribución inicial tales como los máximos y mínimos relativos, así como el ancho de los picos.

Hay que añadir que la potencia de resolución de MCR-ALS se incrementa considerablemente en el caso de análisis simultáneo de varias matrices obtenidas para el mismo sistema mediante diferentes técnicas voltamperométricas [82] o incluso por diversas técnicas analíticas [56]. Las matrices se pueden combinar en la dirección de las filas, de las columnas o de ambas a la vez.

Para determinar el número de las contribuciones químicas, o el número de componentes, se suele aplicar el método de descomposición en los valores singulares (Singular Value Decomposition, SVD) que tiene muchas similitudes con PCA [88]. Este número, ***nS***, se calcula como el pseudorango (el rango matemático en ausencia del ruido) de la matriz **I** de tal manera que se minimice la varianza en la matriz **R**, dejando sólo las contribuciones del error experimental o el ruido. La magnitud de los valores residuales se expresa como el porcentaje de falta de ajuste (*lack-of-fit*, lof) después de calcular el número particular de componentes principales, según la fórmula:

$$lof = \sqrt{\frac{\sum_{i,j}(d_{ij} - \hat{d}_{ij})^2}{\sum_{i,j} d_{ij}^2}} \qquad (3.26)$$

Los valores experimentales son d_{ij} y los correspondientes valores calculados por SVD son $\hat{d}_{ij}$ [82]. Un método alternativo consiste en la estimación inicial por el método de análisis de factores emergentes (Evolving Factor Análisis, EFA) que proporciona la estimación de regiones o "ventanas" donde existe cada componente. También se puede realizar la estimación inicial de los voltamperogramas individuales [82].

Finalmente, a partir de la estimación inicial de los perfiles de concentraciones o de los voltamperogramas individuales se inicia la optimización por mínimos cuadrados alternados (ALS) aplicando una serie de restricciones. Este procedimiento se puede expresar matemáticamente como se enseña en la Figura 3.15.

MCR-ALS permite además, el estudio simultáneo de diversas matrices, correspondientes a uno o varios sistemas, obtenidas mediante una o más técnicas de análisis. Por ejemplo, supongamos que disponemos de n matrices de datos obtenidas para un sistema bajo diferentes condiciones experimentales iniciales (diferentes relaciones metal-ligando) y con la misma técnica electroquímica (Figura 3.15). El conjunto de matrices I_n sería el siguiente:

$$\mathbf{I_n = C_n \,.\, V^T_n + R_n} \qquad n = 1, 2, \ldots \qquad (3.27)$$

donde $\mathbf{C_n}$ representa la matriz de los perfiles de concentración de las especies electroactivas en $\mathbf{I_n}$, y $\mathbf{V^T_n}$ la matriz de los voltamperogramas unitarios de cada una de esas especies. Si el número y la naturaleza de las columnas (potenciales) es la misma para todas las matrices, el análisis se puede llevar a cabo simultáneamente sobre todas ellas, o lo que es lo mismo,

sobre la matriz aumentada que las contiene a todas. En la Figura 3.15 se detallan las diferentes disposiciones matriciales en las que se pueden organizar los datos voltamperométricos disponibles teniendo en cuenta la manera en que se ha efectuado el seguimiento experimental del sistema en estudio.

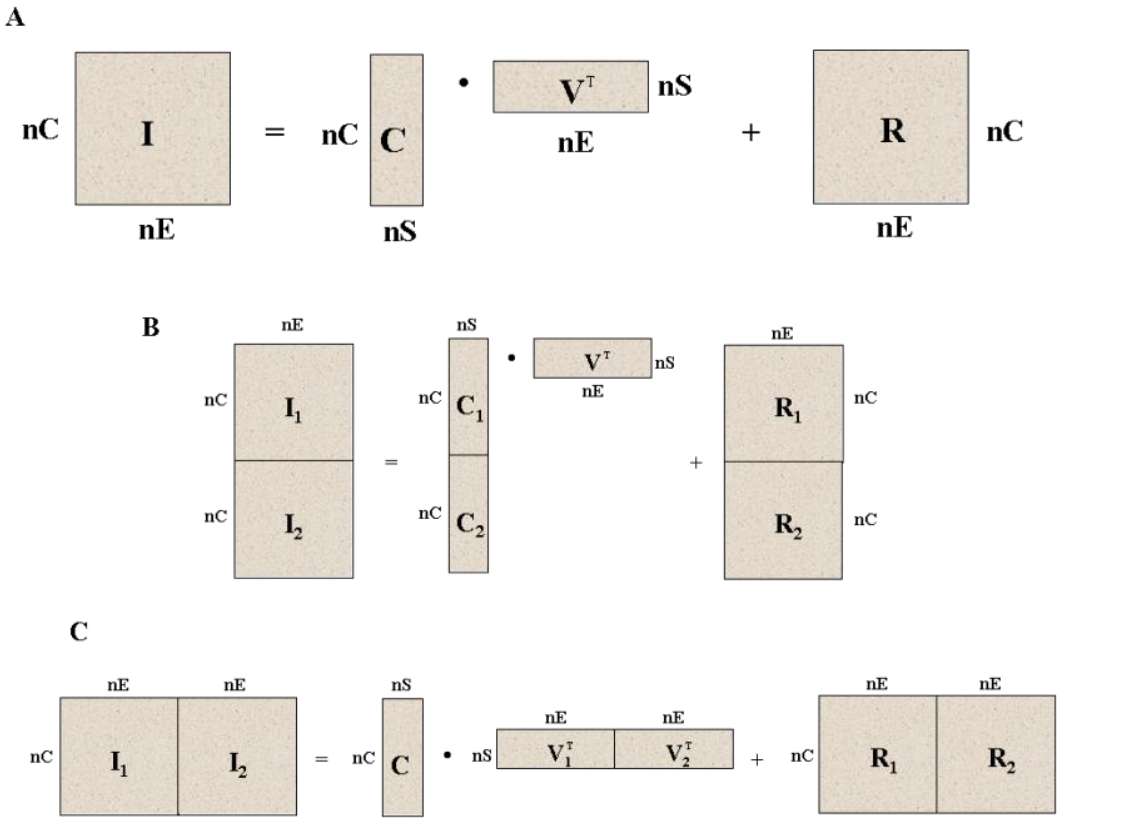


Figura 3.15 – Diferentes ejemplos de análisis de matrices aumentadas por MCR-ALS: A) un único experimento con una sola técnica, B) diferentes experimentos con la misma técnica, C) un mismo experimento con diferentes técnicas.

La complejidad de los datos también ha hecho necesaria la utilización de técnicas complementarias a las voltamperométricas para ayudar a discernir entre posibles modelos de complejación. Alguna de estas técnicas, como el CD, permiten combinar sus datos con los voltamperométricos y realizar así un análisis multivariante conjunto (Figura 3.15.C). En estos casos, el número de las filas (diferentes relaciones metal-ligando) para las diferentes técnicas, tiene que ser la misma para todas las matrices, con objeto de permitir el análisis simultáneo.

Las soluciones obtenidas por este procedimiento tienen sentido matemático, pero desde la perspectiva físico-química pueden no tener sentido o ser incluso absurdas. Para dotar a los resultados de este sentido físico-químico, durante la optimización se aplica una serie de restricciones [11, 82, 89], entre las cuales se pueden destacar:

- no negatividad de concentraciones y/o de señales Se puede aplicar a todos los perfiles de concentraciones y a los voltamperogramas, obligando a que todos los valores de un perfil de respuesta, o sea los valores de intensidad y/o concentración, sean positivos:

- unimodalidad de concentraciones y de señales;

- selectividad; Es la restricción fundamental y está relacionada con la estructura interna de los datos. Las zonas selectivas de un compuesto son aquellas en las que solo éste se halla presente. Así, la selectividad se puede aplicar en el primer punto de las series de valoración en donde se sabe que únicamente el ion metálico o el ligando está presente. En este punto, no existe complejo, ya que todavía no se ha añadido ligando o ion metálico;

- "closure" (sistema cerrado); Esta condición se aplica a las concentraciones y fuerza a la optimización por ALS a cumplir que la suma de concentraciones de todas las especies que contienen metal (o ligando) sea igual a la concentración total del ion metálico;

- forma de pico; Obliga a los perfiles de concentración o a los voltamperogramas unitarios a ajustarse a una forma determinada. Esto se logra mediante una ecuación paramétrica cuyos parámetros se optimizan en cada iteración. En la presente Tesis, los voltamperogramas unitarios se han ajustado a la ecuación:

$$v = \frac{a}{d}\left(1+\exp\left\{\frac{E+c\ln(d)-b}{c}\right\}\right)^{\frac{1-d}{d}} x\left(d+1\right)^{\frac{1+d}{d}} \exp\left\{\frac{E+c\ln(d)-b}{c}\right\} \qquad (3.28)$$

o

$$v = a\left[1+\exp\left(-\frac{E+c\ln(d)-b}{c}\right)\right]^{-d-1} d^{-d}(d+1)^{d+1}\exp\left(-\frac{E+c\ln(d)-b}{c}\right) \qquad (3.29)$$

donde a,b,c,d son parámetros ajustables y E es el potencial.

La Figura 3.16 presenta el esquema de aplicación de MCR-ALS a los datos voltamperométricos., con la explicación de los programas en entorno de Matlab y las restricciones utilizadas en la presente Tesis. Algunos ejemplos de aplicación de MCR-ALS a los datos electroanalíticos obtenidos mediante varias técnicas en nuestro grupo de investigación se presentan en la Tabla 3. 1, en la cual se ve la potencia y la versatilidad de este método.

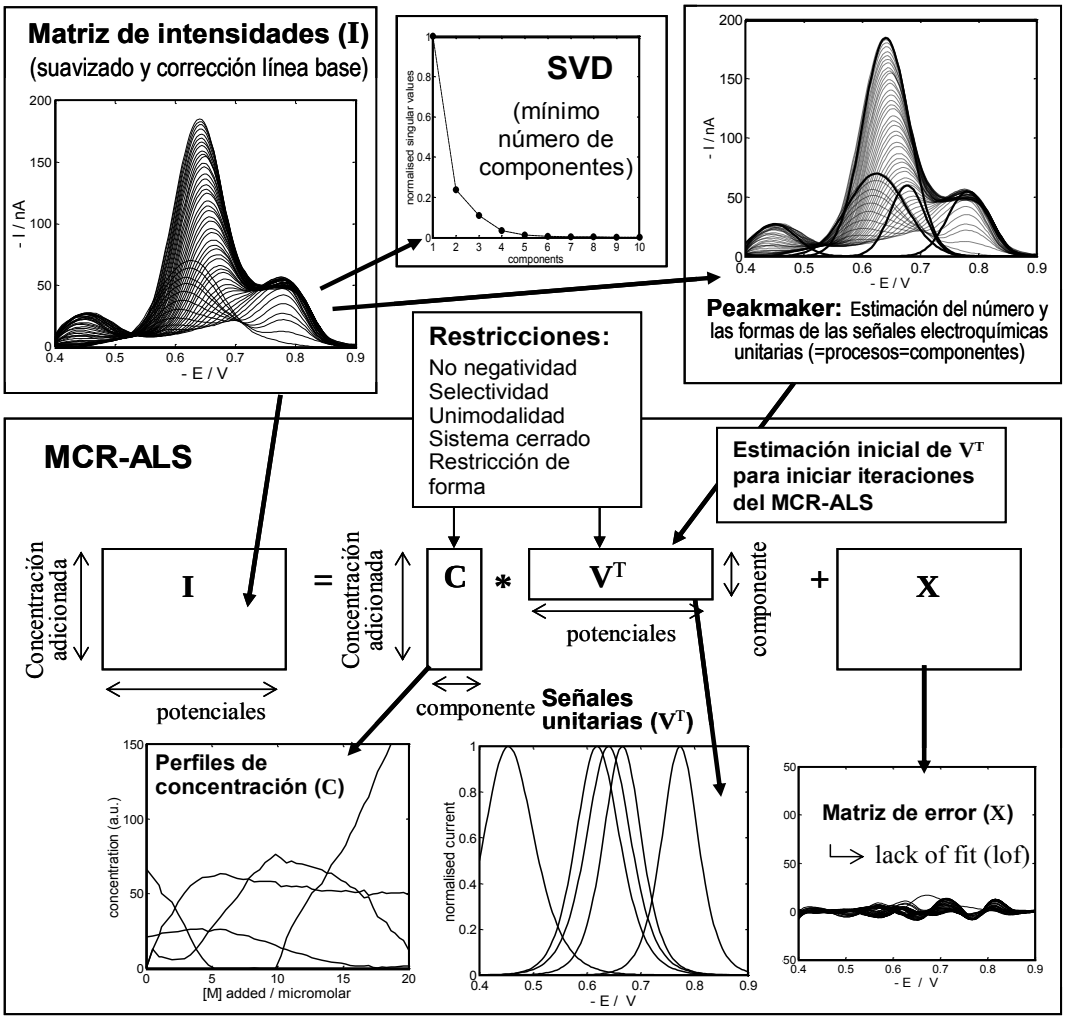


Figura 3.16 – Representación esquemática del análisis de los datos voltamperométricos por MCR-ALS [82].

3.5.3 Aplicaciones para análisis cualitativo

El análisis cualitativo es una parte importante de la práctica analítica. Tales análisis a menudo forman la parte inicial del trabajo, y su fiabilidad y las conclusiones subsiguientes son dependientes en la calidad del análisis cualitativo inicial. En esta sección, proporcionamos una visión general del impacto de la Quimiometría en la resolución y extracción de información cualitativa de complejos, con respuestas electroquímicas altamente solapadas. La mayoría de estudios se ocupan de la interacción de analitos bioquímicos u orgánicos y iones metálicos en la naturaleza, y de mostrar la eficacia de las técnicas electroanalíticasa en sistemas biológicos complejos, y analizar sus señales con la ayuda de técnicas quimiometrícas. Esto habilita la identificación de los componentes individuales [81].

Esteban *et al.* han realizado dos amplias revisiones [12, 90], sobre la aplicación de tratamientos quimiometrícos a datos de electroanálisis. La primera publicación [12] es una visión general de la quimiometría más utilizada y cita 65 artículos, y la segunda [90] es una aproximación más profunda con 183 referencias. En estas dos revisiones, los autores

notaron que el MCR-ALS así como otros métodos de análisis multivariante eran herramientas muy potentes para la interpretación de datos, especialmente en calibración multianalito y modelización en sistemas dinámicos de múltiples componentes. La técnica MCR-ALS, desarrollada originalmente para su utilización con datos de origen espectrofotométrico por Tauler *et al.* [86, 91], se ha ido adaptando y mejorando progresivamente para su utilización con datos voltamperométricos. Hasta el momento su aplicación ha dado resultados muy satisfactorios, especialmente en sistemas con diversos picos u ondas que se solapan y que van evolucionando tanto en su forma como en su situación, a lo largo de los experimentos. Esto es especialmente cierto en comparación con aquellos casos en los que no se utiliza ninguna técnica de análisis multivariante, y sólo se emplean los valores de intensidades y potenciales de pico o de semionda; es decir, cuando se emplea una aproximación univariante.

La Tabla 3.1 resume algunos los estudios más destacados realizados hasta ahora con la técnica MCR-ALS, indicando los sistemas estudiados en cada caso y las técnicas empleadas (voltamperométricas y espectroscópicas, en algún caso concreto).

Tabla 3.1 – Ejemplos de aplicación de MCR-ALS a los datos obtenidos en los experimentos por varias técnicas con diferentes sistemas metal/ligando.

Sistemas	Técnicas	Electrodo	Referencias
Cd – GSH	DPV, CD	Hg	56
Cd – PC_2	DPV	BiFE, Hg	92, 93
Cd – PGA, PMA	ACP, DPV, RPP		94
Cd – Zn – FT	DPV, SWV		95
Cd – Zn – MT	DPV, NPP, RPP	Hg	96
Cd – Zn – PC_3	DPV		97
Cd – Zn – PC_4	DPV, ESI-MS, ITC		98
Hg – Cys, Cys-Gly, GSH	DPV, ESI-MS, ITC		99
Hg – PC_2, PC_3, PC_4	DPV, ESI-MS, ITC	AuRDE	100
Pb – Cys-Gly, PC_2,PC_3	DPV	Hg	101
Zn – GSH	DPV,NPP, RPP		102

Compuestos:

GSH, glutatión; $PC_{2\text{-}4}$, fitoquelatina $(\gamma\text{-Glu-Cys})_{2\text{-}4}$Gly; PGA, ácido poligalacturonico; PMA, ácido polimetacrílico; FT, fragmento C-terminal de la metalotioneína de mamífero: Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala; MT, metalotioneína.

Técnicas:

DPV, Voltamperometría de Impulsos Diferencial; CD, Dicroísmo Circluar; ACP, polarografía de corriente alterna; RPP, Polarografía de Impulsos Inversa; SWV, Voltamperometría de Onda Cuadrada. NPP, Polarografía de Impulsos Normal; ESI-MS, espectrometría de masas; ITC, valoracion calorimétrica isotérmica; AuRDE, Electrodo de disco rotatorio de Au; BiFE, electrodo de película de Bi.

3.5.4 Nuevas estrategias y herramientas

Las características peculiares de algunos sistemas han hecho necesario el desarrollo de nuevas restricciones en los algoritmos de análisis multivariante, como las restricciones de forma (ajuste de señales sigmoidales o en forma de pico a una función determinada o ajuste de las concentraciones a un modelo de equilibrios de complejación sucesivos). Además, fue también necesario abordar el problema de la falta de linealidad producida por el desplazamiento de las señales en el eje de potenciales (*p.e.* como consecuencia de equilibrios rápidos) o el ensanchamiento de los picos (debido a pérdidas de reversibilidad electroquímica), con el desarrollo de algoritmos de corrección previa o simultánea al análisis multivariante.

Así se desarrollaron en el grupo nuevas herramientas quimiometricas:

- *Shiftfit*. Resuelve matrices de voltamperogramas con señales solapadas que se desplazan a lo largo del eje de potenciales [103].
- *pHfit*. Resuelve matrices de voltamperogramas medidos a diferentes valores de pH que contienen señales solapadas que se desplazan a lo largo del eje de potenciales [104].
- *Gaussian Peak Adjustment* (GPA). Resuelve matrices de voltamperogramas con picos solapados que se desplazan a lo largo del eje de potenciales y modifican su anchura y/o simetría mediante el ajuste de un doble pico gaussiano [105].

3.5.4.1 Shiftfit

La aplicación del programa *shiftfit* [103] 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 $\mathbf{V_{shift,i}}$ la cual se optimiza en un proceso iterativo mediante los programas *shiftcalc* y *shiftfit*, algoritmos de mínimos cuadrados no lineales. Como resultado se obtienen las matrices optimizadas $\mathbf{V_{shift}}$ y $\Delta\mathbf{E}$. Una vez obtenidas estas matrices, se calcula para cada voltamperograma una matriz $\mathbf{C_i = I_{exp,i}[(V_{shift,i})^T]}$ como estimación de los perfiles de concentración para los componentes ya desplazados y una matriz reproducida $\mathbf{I_{rep}}$, que una vez agrupada para todos los voltamperogramas, puede compararse con la $\mathbf{I_{exp}}$ con objeto de calcular el lof. En la Figura 3.17 se presenta un esquema de aplicación del programa *shiftfit* a una matriz experimental.

Aparte de la matriz $\mathbf{I_{rep}}$ y la matriz C, la aplicación *shiftfit* origina también una matriz corregida (Icor), donde cada señal está movida y alineada según 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 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.

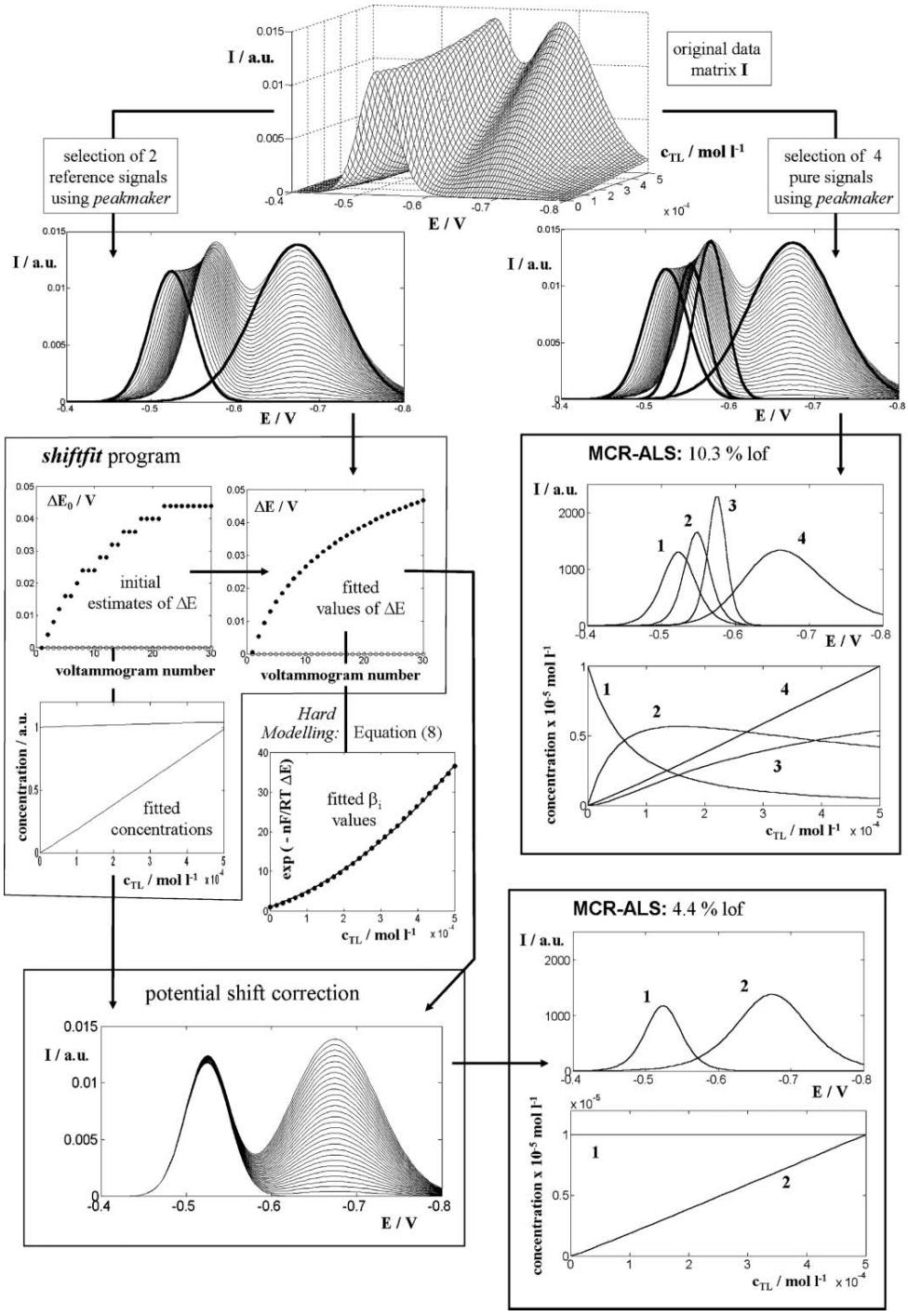


Figura 3.17 – Comparación entre los procedimientos MCR-ALS sencillo y MCR-ALS con una corrección de desplazamiento de potencial preliminar (mediante el programa *shiftfit*) [103].

3.5.4.2 pHfit

A pesar de la complejidad inherente del problema de desplazamiento de señales en valoraciones con cambios de pH, muchos autores suponen una relación semi-empirica entre el potencial de pico de la señal (E_p) y el pH:

$$E_p = k - 0.058\frac{m}{n}pH \tag{3.30}$$

En que *k* es una constante relacionada con el potencial de reducción formal del ión metálico . Esto significa que la pendiente de la recta Ep *vs.* pH permite obtener la proporción de intercambio entre los protones (H^+) y los electrones (e^-) de la reducción electroquímica del complejo, el cual es útil en la formulación de modelos de complejación.

Desafortunadamente, los sistemas experimentales no presentan una evolución tan sencilla. De hecho, la situación es bastante dependiente de la distribución de diferentes especies protonadas del ligando libre. Se puede verificar dos extremos: a valores de pH demasiado altos (la concentración de H^+ es demasiado pequeña para protonar el ligando o el complejo) o valores de pH demasiado ácido (el ligando está ya protonado en la forma complejada o la complejación es insignificante). Estas consideraciones están confirmadas por la evolución sigmoidea de muchas curvas experimentales ΔE vs. pH. Para modelizar este comportamiento, se puede aplicar una ecuación sigmoidea paramétrica en la forma:

$$\Delta E = \frac{a}{1+e^{b(pH-c)}} + d \tag{3.31}$$

Con a, b, c, d siendo parámetros ajustables. En la proximidad del punto de inflexión, la sigmoide se aproxima a una línea recta, cuya pendiente viene dada por:

$$\max.slope = -\frac{a\,b}{4} \tag{3.32}$$

La Figura 3.18 resume cómo el algoritmo pHfit [104] funciona para los diferentes tipos de curvas. En el ejemplo propuesto, las tres señales, A, B y C, presentan una evolución sigmoide, inmóvil y lineal, respectivamente. La matriz experimental I_{exp} contiene todas las mediciones de corrientes y tiene tantas líneas como voltamperogramas (valores de pH considerados) y tantas columnas como potenciales escaneados. A partir de la inspección visual de I_{exp}, se pueden establecer las señales puras de referencia y reunirlas en una matriz V_0. Esto puede ser escogido arbitrariamente, normalmente a valores de pH donde la señal está bien definida y no padece fuerte solapamiento con otras señales.

Cada voltamperograma medido a un pH_i determinado (I_{exp}, i) se descompone como producto de un vector C_i, conteniendo las concentraciones de todos los componentes, por la matriz V_{shift}^T conteniendo los voltamperogramas puros desplazados (siendo 'T' la matriz traspuesta) más un error. El producto $C_i V_{shift}^T$ es el voltamperograma reproducido en el pH_i (I_{exp}, i).

Cuando todos los voltamperogramas reproducidos han sido evaluados, son integrados en la matriz I_{rep}. De una forma similar, los valores de concentración calculados para cada pH se integran en la matriz C. Las matrices reproducidas y experimentales son entonces comparadas mediante el porcentaje de lof.

Entonces, el programa *pHfit* cambia el valor de los parámetros iniciales de las sigmoides y/o líneas rectas, utiliza *pHcalc* para calcular una nueva matriz reproducida y mantendrá el proceso iterativo hasta que se alcance un lof satisfactorio. A partir de los valores

optimizados de (a–d) y/o (a'–b'), se pueden obtener parámetros útiles como la proporción m/n o el punto inflexión del pH. Además, es posible obtener una matriz corregida por los efectos de no-linealidad, I_{cor}, en la forma:

$$\mathbf{I}_{cor} = \mathbf{C}\mathbf{V}_0^{T} \qquad (3.33)$$

Los datos así corregidos pueden ser analizados con técnicas quimiometricas lineales como MCR-ALS o PLS.

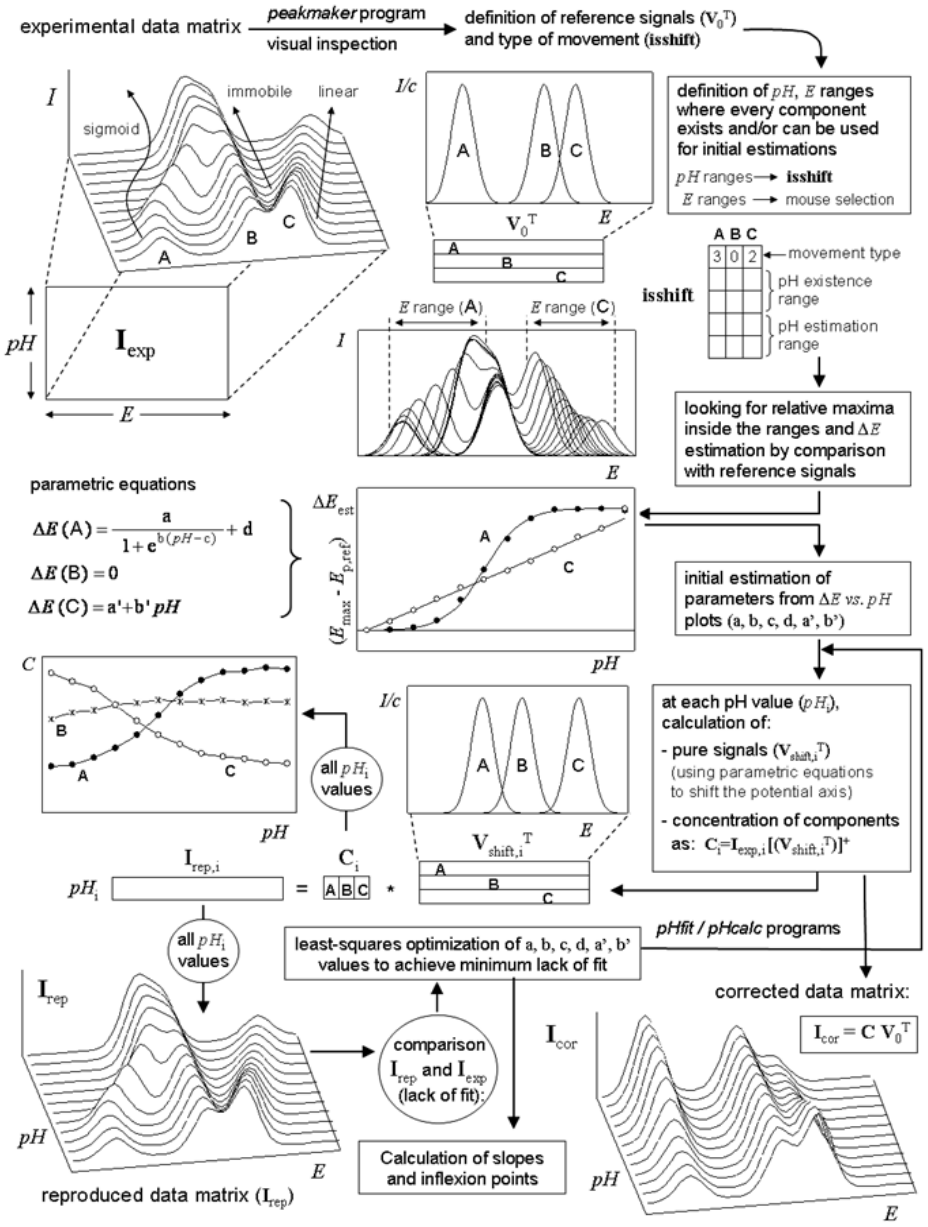


Figura 3.18 – Esquema de la metodología propuesta para la Resolución Multivariante de Curvas no-lineal de un conjunto de datos correspondiente a una valoración de pH voltamperometrica mediante los programas *pHfit* y *pHcalc*. El ejemplo propuesto incluye tipos de señales en función de su evolución con pH: sigmoide (A), Inmóvil (B) y lineal (C) [104].

3.5.4.3 Ajuste mediante picos gaussianos

Para modelizar aquellas señales voltamperométricas con forma de pico que no sólo se desplazan en el eje de potencial, sino que también modifican su anchura durante las valoraciones, se ha desarrollado el algoritmo *Gaussian Peak Adjustment* (GPA) [105], que ajusta cada señal a un par de picos gaussianos, uno a la izquierda del máximo y el otro a la derecha. Las ecuaciones para ambos lados del pico y para la anchura a media altura y el área son:

$$I_{izquierda} = [c\exp[-b(E-a)]^2] \tag{3.34}$$

$$I_{derecha} = [c\exp[-d(E-a)]^2] \tag{3.35}$$

$$W_{1/2} = W_{1/2,iz} + W_{1/2,d} = \sqrt{\frac{ln2}{b}} + \sqrt{\frac{ln2}{d}} = \sqrt{\ln 2}\left(\frac{1}{\sqrt{b}} + \frac{1}{\sqrt{d}}\right) \tag{3.36}$$

$$Area = \int_{-\infty}^{a} ce^{-b(E-a)^2}dE + \int_{a}^{\infty} ce^{-d(E-a)^2}dE = \frac{c\sqrt{\pi}}{2}\left(\frac{1}{\sqrt{b}} + \frac{1}{\sqrt{d}}\right) \tag{3.37}$$

donde la Ecuación 3.34 es válida para valores de potenciales E≤a y la Ecuación. 3.35 es válida para E≥a. Los parámetros ajustables ‘a’ y ‘c’ determinan la posición y altura del pico, respectivamente, y son comunes a ambas funciones gaussianas.

En el caso de procesos irreversibles, el área de las señales de impulsos diferenciales puede ser una indicación mejor de la concentración que la altura del pico (dada por el parámetro ‘c’). Además, la simetría del pico está determinada por la proporción (b/d): cuanto más diferente de uno , más asimétrico será el pico.

La Figura 3.19 resume los pasos principales del procedimiento de ajuste. Primero, se define una señal de referencia para cada componente (*p. e.*, utilizando el programa *peakmaker*) y se integra en la matriz **esv**. Además, se incluye en la matriz (**isshift**) el rango de existencia correspondientes (en el ejemplo mostrado en Figura 3.19, del experimento 1 a 12 para el primer componente y 2 a 12 para el segundo) y el tipo de movimiento y/o ensanchamiento de las señales (expresados con los dígitos 1 o 0). Para rangos de existencia más complicados (*p. ej.*, si un componente desaparece y aparece más tarde), puede utilizarse la matriz **csel**. Entonces, las señales de referencia se ajustan a las Ecuaciones 3.34 y 35 para obtener valores iniciales de los parámetros ‘a’, ‘b’, ‘c’ y ‘d’. La exactitud de la estimación de las señales es clave para obtener un *lof* aceptable, especialmente si algunos parámetros como la posición de pico o la anchura son constantes durante el ajuste. Al llegar a este punto, el ajuste de mínimos cuadrados optimiza dichos parámetros de modo que el conjunto de todos los picos a lo largo de los voltamperogramas produzca una matriz reproducida ($\mathbf{I_{rep}}$) tan similar como sea posible a la matriz experimental ($\mathbf{I_{exp}}$). La diferencia entre ambas matrices se cuantifica mediante la falta de ajuste calcula la matriz corregida (I_{cor}), que se

obtendría en ausencia de cambios en la posición de pico, el ancho y/o la simetría. Una vez conseguida la convergencia, se obtiene la evolución de los cuatro parámetros en función del número de experimento y, por tanto es posible calcular la evolución de la concentración (en alturas de pico o áreas), el potencial de pico (E_p) y la anchura de pico a media altura ($W_{1/2}$) de cada componente.

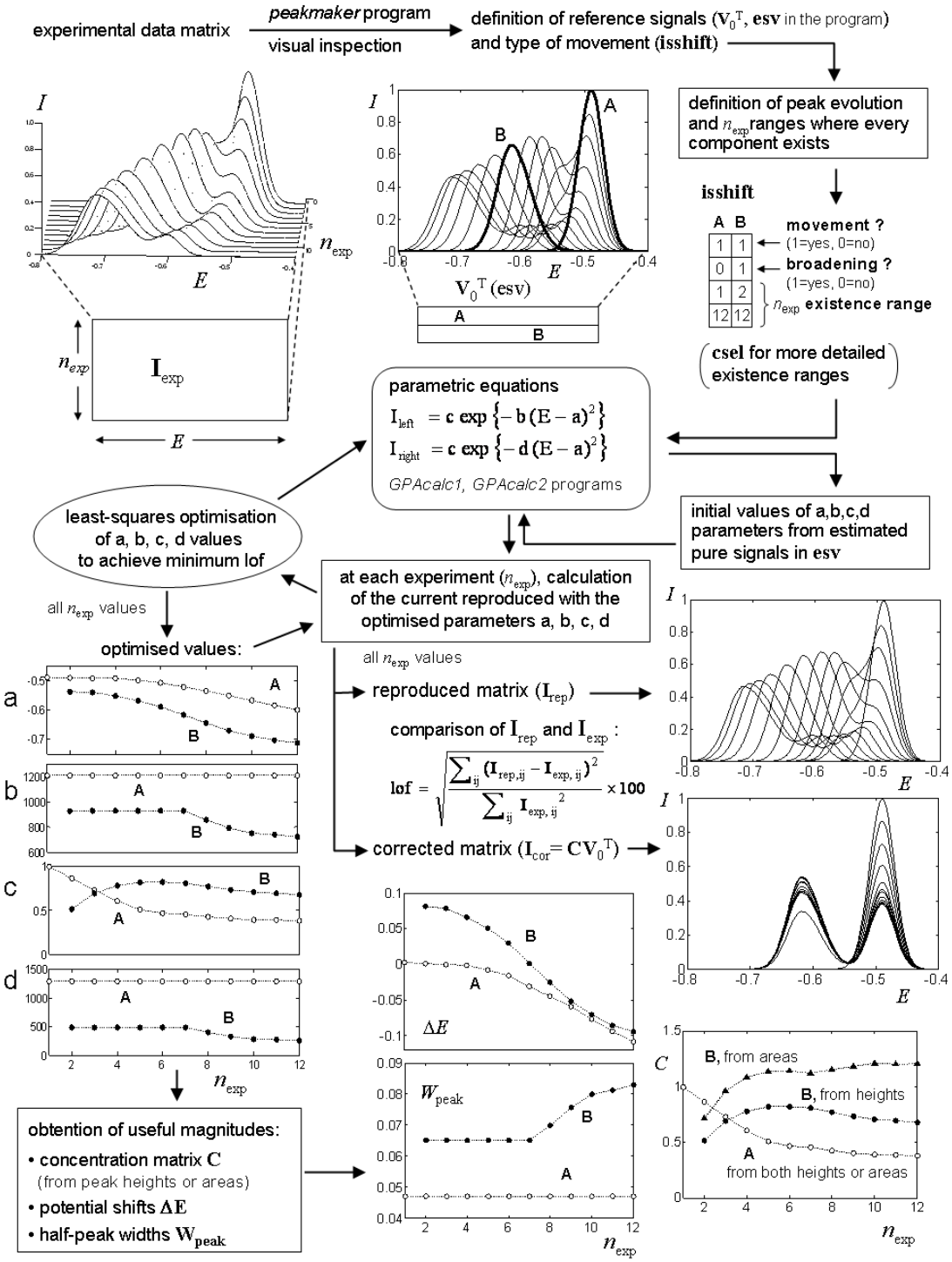


Figura 3.19 – Esquema de la metodologia propuesta para el algoritmo GPA [105].

3.6 Referencias

1. Zuman, P., *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2001,** *31* (4), 281-289.
2. Brett, C. M. A.; Brett, A. M. O., *Electrochemistry. Principles, methods and applications*. Oxford University Press: Oxford, 1994.
3. Wang, J., *Analytical Electrochemistry*. John Wiley & Sons: New Jersey, 2006.
4. Compton, R. G.; Banks, C. E., *Understanding Voltammetry*. Imperial College Press: London, 2011.
5. Heyrovský, M., *Chemical Record* **2012,** *12* (1), 14-16.
6. Heyrovský, M., *Journal of Solid State Electrochemistry* **2010**, 1-5.
7. Heyrovský, J., *Science* **1960,** *132* (3420), 123-130.
8. Batchelor-McAuley, C.; Dickinson, E. J. F.; Rees, N. V.; Toghill, K. E.; Compton, R. G., *Analytical Chemistry* **2011,** *84* (2), 669-684.
9. Kimmel, D. W.; LeBlanc, G.; Meschievitz, M. E.; Cliffel, D. E., *Analytical Chemistry* **2011,** *84* (2), 685-707.
10. Cox, J. T.; Zhang, B., *Annual Review of Analytical Chemistry* **2012,** *5* (1), 253-272.
11. Diaz-Cruz, M. S.; Diaz-Cruz, J. M.; Mendieta, J.; Tauler, R.; Esteban, M., *Analytical Biochemistry* **2000,** *279* (2), 189-201.
12. Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M., *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2006,** *25* (1), 86-92.
13. Lingane, J. J., *Chemical Reviews* **1941,** *29* (1), 1-35.
14. Crow, D. R., *Polarography of Metal Complexes*. Academia Press: London, 1969.
15. de Jong, H. G.; Van Leeuwen, H. P., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1987,** *234* (1-2), 17-29.
16. Heyrovsky, J.; Kuta, J., *Principles of Polarography*. Academic Press: New York, 1966.
17. White, P. C.; Lawrence, N. S.; Davis, J.; Compton, R. G., *Electroanalysis* **2002,** *14* (2), 89-98.
18. Kruusma, J.; Benham, A. M.; Williams, J. A. G.; Kataky, R., *Analyst* **2006,** *131* (4), 459-473.
19. Harfield, J. C.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G., *Analyst* **2012,** *137* (10), 2285-2296.
20. von Wandruszka, R.; Yuan, X.; Morra, M. J., *Talanta* **1993,** *40* (1), 37-42.
21. Scarano, G.; Morelli, E., *Analytica Chimica Acta* **1996,** *319* (1–2), 13-18.
22. Ion, A.; Bănică, F. G.; Fogg, A. G.; Kozlowski, H., *Electroanalysis* **1996,** *8* (1), 40-43.
23. Yosypchuk, B.; Šestáková, I.; Novotný, L., *Talanta* **2003,** *59* (6), 1253-1258.
24. Sanz Alaejos, M.; Diaz Romero, C., *Chemical Reviews* **1995,** *95* (1), 227-257.
25. Adeloju, S. B.; Bond, A. M.; Briggs, M. H., *Analytical Chemistry* **1984,** *56* (13), 2397-2401.
26. Alanyalioglu, M.; Demir, U.; Shannon, C., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004,** *561* (0), 21-27.
27. Santos, M. C.; Machado, S. A. S., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2004,** *567* (2), 203-210.
28. van den Berg, C. M. G.; Khan, S. H., *Analytica Chimica Acta* **1990,** *231* (0), 221-229.
29. Grier, R. A.; Andrews, R. W., *Analytica Chimica Acta* **1981,** *124* (2), 333-339.
30. Beni, V.; Collins, G.; Arrigan, D. W. M., *Analytica Chimica Acta* **2011,** *699* (2), 127-133.
31. Ochsenkuhn-Petropoulou, M.; Tsopelas, F., *Analytica Chimica Acta* **2002,** *467* (1-2), 167-178.
32. Heyrovský, M.; Mader, P.; Veselá, V.; Fedurco, M., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1994,** *369* (1-2), 53-70.

33. Ochsenkuhn-Petropoulou, M. T.; Tsopelas, F. N., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2004,** *379* (5-6), 770-776.
34. Bai, Y.; Yan, X.; Li, R.; Zheng, W.; Yang, F., *Electroanalysis* **2005,** *17* (17), 1511-1515.
35. Gammelgaard, B.; Cornett, C.; Olsen, J.; Bendahl, L.; Hansen, S. H., *Talanta* **2003,** *59* (6), 1165-1171.
36. Bai, Y.; Wang, T.; Liu, Y.; Zheng, W., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2009,** *74* (1), 150-153.
37. Wang, T.; Bai, Y.; Luo, H.; Yan, X.; Zheng, W., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2011,** *657* (1–2), 74-78.
38. Feroci, G.; Fini, A.; Badiello, R.; Breccia, A., *Microchemical Journal* **1997,** *57* (3), 379-388.
39. Cikrt, M.; Bencko, V., *Toxicology Letters* **1989,** *48* (2), 159-164.
40. Gailer, J.; George, G. N.; Pickering, I. J.; Madden, S.; Prince, R. C.; Yu, E. Y.; Denton, M. B.; Younis, H. S.; Aposhian, H. V., *Chemical Research in Toxicology* **2000,** *13* (11), 1135-1142.
41. Biot, J. B., *Journal* **1812,** *1*, 1-372.
42. Fresnel, A., *Société Philomathique de Paris* **1824**, 147-158.
43. Casella, L.; Gullotti, M., *Journal of the American Chemical Society* **1983,** *105* (4), 803-809.
44. Que, L., *Physical Methods in Bioinorganic Chemistry – Spectroscopy and Magnetism*. University Science Books: Sausalito, US, 2000.
45. Zsila, F.; Bikádi, Z.; Fitos, I.; Simonyi, M., *Current drug discovery technologies* **2004,** *1* (2), 133-153.
46. Bulheller, B. M.; Rodger, A.; Hirst, J. D., *Physical Chemistry Chemical Physics* **2007,** *9* (17), 2020-2035.
47. Kelly, S. M.; Jess, T. J.; Price, N. C., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **2005,** *1751* (2), 119-139.
48. Whitmore, L.; Wallace, B. A., *Biopolymers* **2008,** *89* (5), 392-400.
49. Sigel, H.; Martin, R. B., *Chemical Reviews* **1982,** *82* (4), 385-426.
50. Martin, R. B.; Tsangaris, J. M.; Chang, J. W., *Journal of the American Chemical Society* **1968,** *90* (3), 821-823.
51. Tsangaris, J. M.; Chang, J. W.; Martin, R. B., *Journal of the American Chemical Society* **1969,** *91* (3), 726-731.
52. Tsangaris, J. M.; Martin, R. B., *Journal of the American Chemical Society* **1970,** *92* (14), 4255-4260.
53. Mehra, R. K.; Kodati, V. R.; Abdullah, R., *Biochemical and Biophysical Research Communications* **1995,** *215* (2), 730-736.
54. Mehra, R. K.; Miclat, J.; Kodati, V. R.; Abdullah, R.; Hunter, T. C.; Mulchandani, P., *Biochem J* **1996,** *314* (1), 73-82.
55. Ősz, K.; Bóka, B.; Várnagy, K.; Sóvágó, I.; Kurtán, T.; Antus, S., *Polyhedron* **2002,** *21* (21), 2149-2159.
56. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2007,** *584* (2), 403-409.
57. Skoog, D. A.; Leary, J. J., *Análisis Instrumental*. Mc. Graw Hill: Madrid, 1996.
58. Aebersold, R.; Mann, M., *Nature* **2003,** *422* (6928), 198-207.
59. Domon, B.; Aebersold, R., *Science* **2006,** *312* (5771), 212-217.
60. Fenn, J. B.; Mann, M.; Meng, C. K.; Wong, S. F.; Whitehouse, C. M., *Science* **1989,** *246* (4926), 64-71.
61. Rubinson, K. A.; Rubinson, J. F., *Análisis Instrumental*. Pearson Education S.A.: Madrid, 2001.

62. Henderson, W.; McIndoe, J. S., *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*. John Wiley & Sons: Chichester, 2005.
63. Pramanik, B. N.; Ganguly, A. K.; Gross, M. L., *Applied Electrospray Mass Spectrometry*. Marcel Dekker, Inc.: New York, 2002.
64. Stewart, I. I., *Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy* **1999,** *54* (12), 1649-1695.
65. Olesik, J. W.; Thaxton, K. K.; V. Olesik, S., *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **1997,** *12* (5), 507-515.
66. Di Marco, V. B.; Bombi, G. G., *Mass Spectrometry Reviews* **2006,** *25* (3), 347-379.
67. Atkins, P.; de Paula, J., *Atkins' Physical Chemistry*. 7th ed.; Oxford University Press: New York, 2002.
68. Ott, J. B.; Bodrio-Goates, J., *Chemical Thermodynamics, Principles and Application, Advanced Applications*. Academic Press: London, 2000.
69. Ladbury, J. E.; Chowdry, B. Z., *Biocalorimetry, Applications of Calorimetry in Biological Sciences*. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester, 1998.
70. Luque, I., Biophysics of Protein–Protein Interactions. In *Protein Surface Recognition*, John Wiley & Sons, Ltd: 2010; pp 23-52.
71. Williams, D. H.; Stephens, E.; O'Brien, D. P.; Zhou, M., *Angewandte Chemie International Edition* **2004,** *43* (48), 6596-6616.
72. Grunwald, E.; Steel, C., *Journal of the American Chemical Society* **1995,** *117* (21), 5687-5692.
73. Krishnamurthy, V. M.; Bohall, B. R.; Semetey, V.; Whitesides, G. M., *Journal of the American Chemical Society* **2006,** *128* (17), 5802-5812.
74. Horn, J. R.; Russell, D.; Lewis, E. A.; Murphy, K. P., *Biochemistry* **2001,** *40* (6), 1774-1778.
75. Wilcox, D. E., *Inorganica Chimica Acta* **2008,** *361* (4), 857-867.
76. DiTusa, C. A.; McCall, K. A.; Christensen, T.; Mahapatro, M.; Fierke, C. A.; Toone, E. J., *Biochemistry* **2001,** *40* (18), 5345-5351.
77. Blasie, C. A.; Berg, J. M., *Biochemistry* **2002,** *41* (50), 15068-15073.
78. Rollin-Genetet, F.; Berthomieu, C.; Davin, A.-H.; Quéméneur, E., *European Journal of Biochemistry* **2004,** *271* (7), 1299-1309.
79. Chu, D.; Tang, Y.; Huan, Y.; He, W.; Cao, W., *Thermochimica Acta* **2000,** *352–353* (0), 205-212.
80. Spuches, A. M.; Kruszyna, H. G.; Rich, A. M.; Wilcox, D. E., *Inorganic Chemistry* **2005,** *44* (8), 2964-2972.
81. Ni, Y.; Kokot, S., *Analytica Chimica Acta* **2008,** *626* (2), 130-146.
82. Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Díaz-Cruz, M. S.; Tauler, R., *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* **2000,** *19* (1), 49-61.
83. Martens, H.; Martens, M., *Multivariate Analysis of Quality. An Introduction*. John Wiley & Sons: Chichester, 2001.
84. Wold, S.; Esbensen, K.; Geladi, P., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1987,** *2* (1-3), 37-52.
85. Beebe, K. R.; Kowalski, B. R., *Analytical Chemistry* **1987,** *59* (17), 1007 A-1017 A.
86. Tauler, R.; Izquierdo-Ridorsa, A.; Casassas, E., *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **1993,** *18* (3), 293-300.
87. Mendieta, J.; Díaz-Cruz, M. S.; Tauler, R.; Esteban, M., *Analytical Biochemistry* **1996,** *240* (1), 134-141.
88. Massart, D. L.; Vandeginste, B. G. M.; Buydens, L. M. C.; Jong, S. D.; Lewis, P. J.; Smeyers-Verbeke, J., *Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Parts A and B*. Elsevier: Amsterdam, 1997.

89. Díaz-Cruz, J.; Tauler, R.; Grabarić, B. S.; Esteban, M.; Casassas, E., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1995,** *393* (1-2), 7-16.

90. Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M., *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2006,** *36* (3-4), 295-313.

91. Tauler, R.; Kowalski, B.; Fleming, S., *Analytical Chemistry* **1993,** *65* (15), 2040-2047.

92. Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Šestáková, I.; Velek, J.; Ariño, C.; Esteban, M., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2002,** *520* (1-2), 111-118.

93. Alberich, A.; Serrano, N.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Talanta* **2009,** *78* (3), 1017-1022.

94. Garrigosa, A. M.; Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Talanta* **2007,** *73* (4), 776-782.

95. Díaz-Cruz, M. S.; Mendieta, J.; Esteban, M., *Electroanalysis* **2002,** *14* (1), 50-56.

96. López, M. J.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Tauler, R.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2003,** *37* (24), 5609-5616.

97. Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2005,** *39* (3), 778-786.

98. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2008,** *42* (8), 2860-2866.

99. Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2010,** *644* (1), 20-24.

100. Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2009,** *43* (18), 7010-7015.

101. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Talanta* **2007,** *71* (1), 344-352.

102. Díaz-Cruz, J. M.; Agulló, J.; Díaz-Cruz, M. S.; Ariño, C.; Esteban, M.; Tauler, R., *Analyst* **2001,** *126* (3), 371-377.

103. (a) Alberich, A.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2008,** *133* (4), 470-477; (b) Alberich, A.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2008,** *133* (1), 112-125.

104. Díaz Cruz, J. M.; Sanchís, J.; Chekmeneva, E.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2010,** *135* (7), 1653-1662.

105. Cavanillas, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2011,** *689* (2), 198-205.

Parte II

Experimental

Capítulo 4

Instrumentación y reactivos

4.1 Instrumentación

4.1.1 Instrumentación electroquímica

Las valoraciones polarográficas se han realizado con el equipo 757 VA Computrace (Metrohm, Switzerland) conectado al ordenador personal mediante el *software* de adquisición de datos VA Computrace 1.0. El elemento central del equipo es el electrodo multimodo que combina el electrodo de gotas de mercurio (DME) y el de gota colgante de mercurio (HMDE) en un único dispositivo (Figura 4.1). El cuerpo del electrodo consiste en un recipiente que contiene el mercurio, que fluye por un capilar de vidrio, formando una gota en la punta del capilar. El flujo de mercurio se controla mediante una aguja que puede subir y bajar neumáticamente. En la presente Tesis se ha utilizado el modo de las gotas de mercurio estáticas (SMDE). En este modo la superficie de la gota es constante y estacionaria. Las valoraciones se han llevado a cabo en el modo de polarografía diferencial de impulsos (DPP). Como electrodo de referencia se ha utilizado un electrodo de Ag|AgCl|3 M KCl y como auxiliar uno de carbono vitrificado.

La Figura 4.1 presenta el montaje instrumental utilizado en las valoraciones polarográficas. La celda polarográfica, que contiene los tres electrodos y la disolución de ión metálico y/o ligando, está cerrada durante la valoración. Antes del inicio de la valoración, y después de cada adición, se pasa el flujo de nitrógeno por la disolución. De esta manera se evita la oxidación de los compuestos y también la presencia de oxígeno en la disolución, que puede afectar a las valoraciones polarográficas.

En las investigaciones realizadas durante la estancia en la *Oxford University* se han utilizado otros electrodos de trabajo: de carbono vitrificado (GCE) y el *edge-plane pyrolytic graphite* (EPPG) que se modifican de forma covalente, agregando un derivado de Ferroceno (Fc). En el caso de GCE, además se modificó previamente su superficie con nanotubos de carbono multicapa (MWCNTs). Las medidas se registraron usando un potenciostato μAutolab type III (EcoChemie, Utrecht, Netherlands). En el Capítulo se describirá de forma más detallada los procedimientos adoptados con estos electrodos.

Las medidas de pH se han llevado a cabo con un electrodo combinado, tipo Ross, Orion 8103SC unido a un pH-metro Orion SA 920A (Orion Research Inc., Boston, USA).

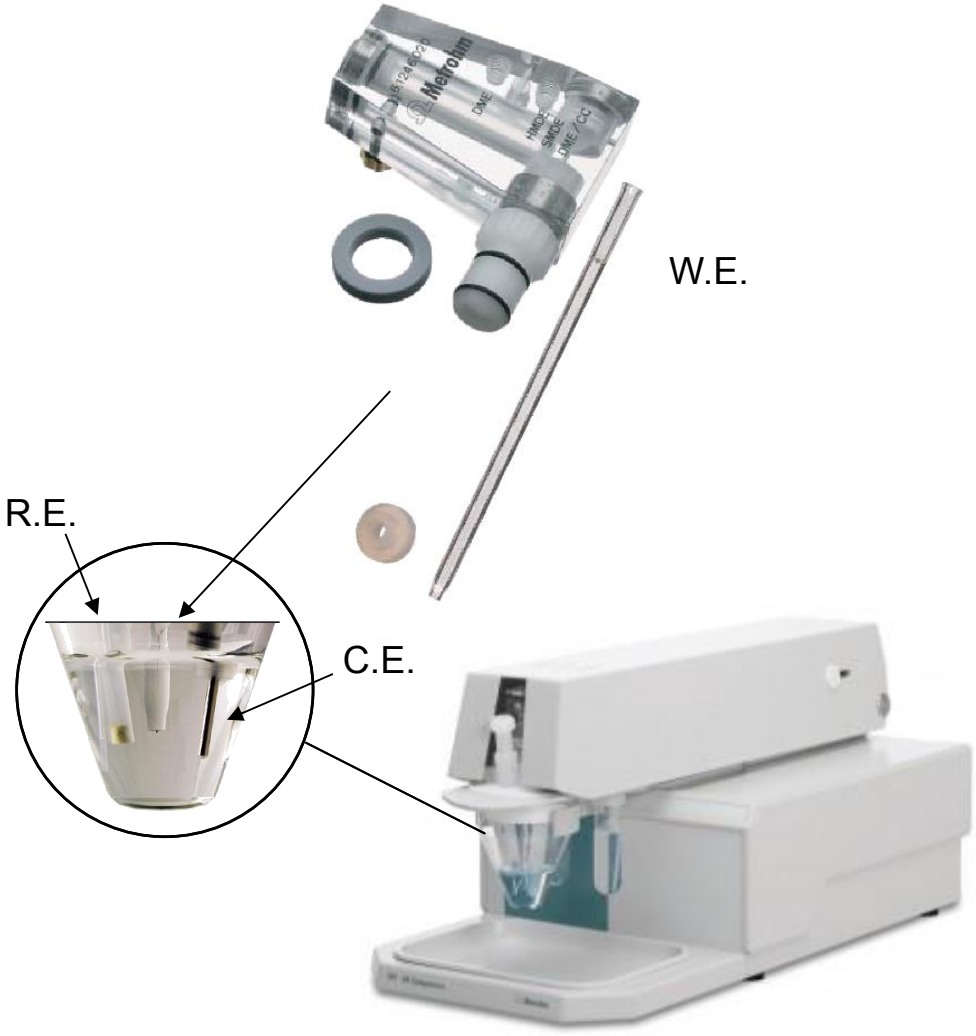


Figura 4.1 – Esquema del montaje experimental utilizado en las valoraciones polarográficas con el detalle del electrodo multimodo de mercurio (SMDE) como electrodo de trabajo (W.E.), electrodo de referencia (R.E.) y electrodo auxiliar (C.E.).

4.1.2 Instrumentación de dicroísmo circular

En la presente tesis se ha utilizado el instrumento de Dicroísmo Circular (CD) localizado en los Serveis Cientificotècnics de la Universitat de Barcelona. Así las medidas por CD se han obtenido utilizando el espectropolarímetro Jasco J-810 (Japan Spectroscopic Corporation, JASCO) equipado con una lámpara de arco de Xe de 150 W (*air cooled*) y controlado por un ordenador personal, mediante el *software* de adquisición de datos *Spectra Analysis* (versión V.1.53.04). La cámara donde se realizaran las medidas se purgó con un caudal de nitrógeno de 5 - 10 L min^{-1}, dependiendo si las medidas se hacían en el UV-lejano (λ< 200 nm) o cercano (λ> 200 nm).

La celda cilíndrica de absorción (Hellma, Deutschland) tiene dos ventanas de cristal de cuarzo. Se utilizó la celda de 10 mm de camino óptico (V_{max}= 2800 µl) como la que se muestra en la Figura 4.2.

Figura 4.2 – Espectropolarímetro Jasco J-810 y la celda cilíndrica de absorción.

4.1.3 Instrumentación de espectrometría de masas

Las medidas mediante Espectrometría de Masas se llevaron a cabo en los Serveis Cientificotècnics en la Facultat de Química. La determinación de las masas de los complejos se hizo mediante un Espectrómetro de Masas con detector de tiempo de vuelo (TOF), de Agilent Technologies, acoplado a Cromatografía de Líquidos (LC), que permite hacer medidas por ionización por electrospray (ESI) por introducción directa y acoplamiento LC/MS. El control instrumental, deconvolución de espectros y el análisis se ha realizado con *MassHunter Workstation Software* (B.02.00). La Figura 4.3 muestra el instrumento empleado.

Figura 4.3 – Espectrómetro de masas de Agilent 6500 Series (ESI-TOF) utilizado en modo de ionización positivo.

4.1.4 Instrumentación microcalorimétrica

Las valoraciones calorimétricas se han llevado a cabo con el microcalorímetro VP-ITC MicroCal (MicroCal, Inc., Northampton, MA), disponible en la Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria del Parc Cientific de Barcelona, y en colaboración con el Dr. Rafel Prohens. Este instrumento mide directamente el calor absorbido o emitido durante el estudio de una interacción metal-ligando. La jeringa inyectora se utiliza también para la agitación subsiguiente de los reactivos. El instrumento consiste en dos celdas: una de trabajo, donde tiene lugar la reacción entre el sustrato y el ligando, y otra de referencia, que contiene el mismo medio (disolvente y disolución amortiguadora) que la de trabajo. Las celdas están fabricadas de Ni Hastelloy® Alloy C 276. El acceso a las celdas, para llenarlas y limpiarlas, está en la parte superior del instrumento. El volumen de trabajo de las celdas es de 1.4 mL, pero el volumen total (contando la celda en forma de moneda y el tubo de acceso a ella) es de 1.8 mL. La Figura 4.4 muestra esquemáticamente el microcalorímetro empleado.

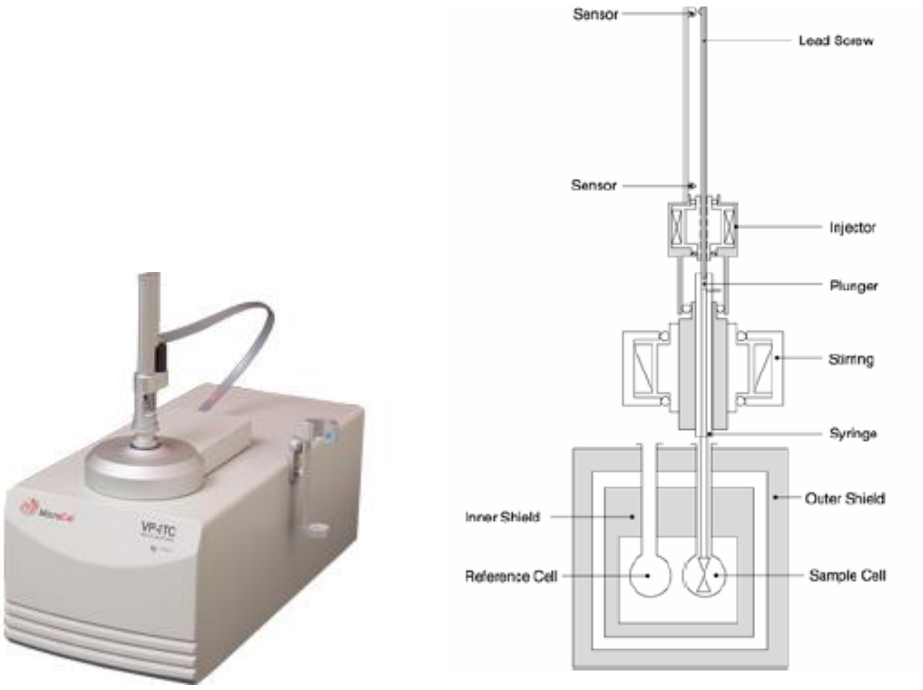


Figura 4.4 – Representación esquemática del microcalorímetro VP-ITC.

4.2 Reactivos y disoluciones

4.2.1 Reactivos

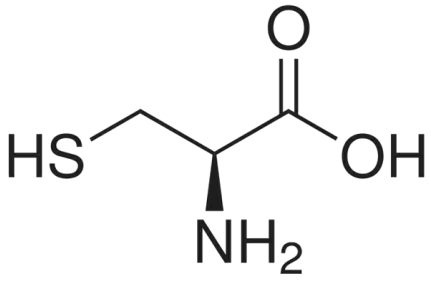
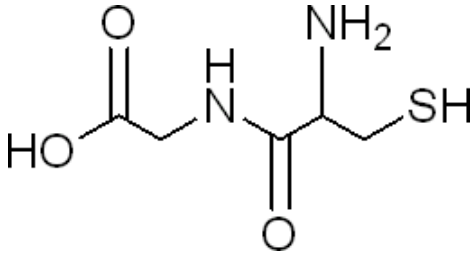
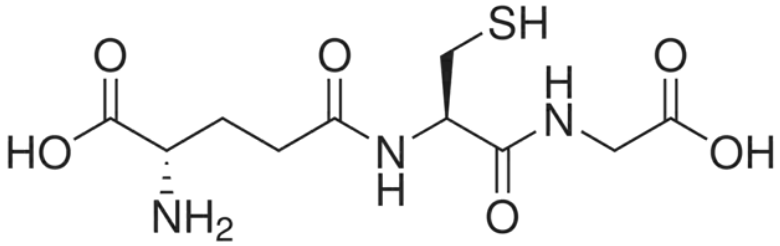
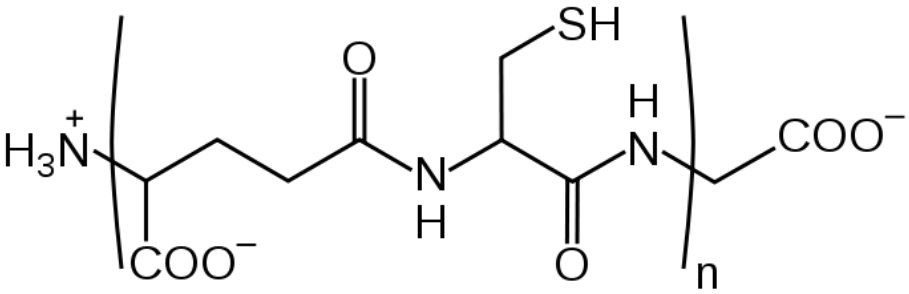
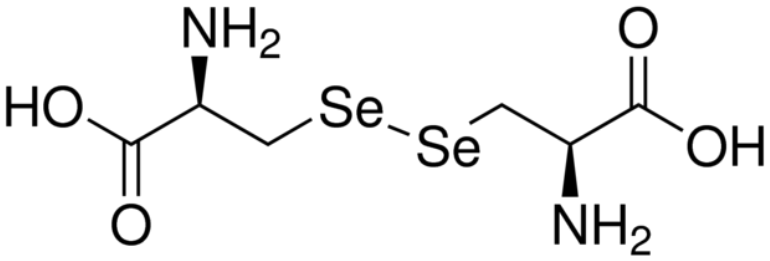
Las disoluciones utilizadas en la presente Tesis se han preparado a partir de los reactivos siguientes:

Tabla 4.1 – Reactivos utilizados en la tesis para la preparación de las disoluciones.

Nombre	Fórmula	Marca
Nitrato de cadmio (II)	$Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Merck
Nitrato de zinc (II)	$Zn(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	Merck
Nitrato de potasio	KNO_3	Merck
Acetato de amonio	$NH_4(CH_3COO)$	Merck
Ácido nítrico	HNO_3	Merck
Ácido acético	CH_3COOH	Merck
Ácido clorhídrico	HCl	Merck
Amoniaco	NH_3	Merck
Hidróxido de potasio	KOH	Merck
Nitrato de plomo (II)	$Pb(NO_3)_2$	Merck
Nitrato de cobre (II)	$Cu(NO_3)_2 \cdot H_2O$	Aldrich
Cloruro de cobalto (II)	$CoCl_2$	Sigma/Aldrich
Nitrato de cromo (III)	$Cr(NO_3)_3 \cdot 9\ H_2O$	Merck
Nitrato de bismuto (III)	$Bi(NO_3)_3 \cdot 5\ H_2O$	Aldrich
Tetraborato de sodio	$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	Sigma/Aldrich
Acetonitrilo	CH_3CN	Merck

Todos los reactivos proceden de las empresas Merck, Sigma/Aldrich o Fluka (grado analítico o suprapuro): El glutatión (GSH, >98%), sus fragmento Cys-Gly, (> 85%) y L-Cisteína (Cys, ≥ 97%), y la Seleno-L-cistina (Secyst, 97%) proceden de Sigma/Aldrich. Las fitoquelatinas $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (PC_n – $2 < n < 5$) han sido sintetizadas por la empresa DiverDrugs, S.L. (Barcelona). La pureza cromatográfica de las fitoquelatinas sintetizadas ha sido en todos los lotes de alrededor del 90%. Las impurezas detectadas son el ácido trifluoroacético (TFA), que se utiliza como par iónico en cromatografía de líquidos (HPLC) de péptidos y proteínas pequeñas, y los fragmentos minoritarios de PC_n, sin los grupos reducidos, con un mínimo impacto sobre los procesos de complejación estudiados. La Tabla 4.2 muestra la estructura de los ligandos estudiados.

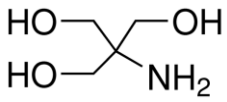
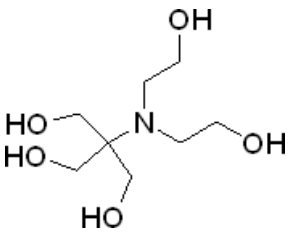
Tabla 4.2 – Ligandos estudiados en la tesis.

Ligando	Estructura	Marca
Cys		Aldrich
Cys-Gly		Sigma
GSH		Sigma-Aldrich
PC_n (2<n<5)		DiverDrugs
Secyst		Aldrich

4.2.2 Preparación de las disoluciones

Todas las disoluciones se han preparado utilizando agua ultrapura Milli-Q 185 (Millipore). Todas las valoraciones de complejación se han llevado a cabo usando disoluciones amortiguadoras de pH. Para las valoraciones mediante las técnicas electroanalíticas se preparan las disoluciones amortiguadores a concentraciones 0.1 - 0.05 M, con adición de KNO_3 hasta una concentración de 0.1 M. Para las valoraciones por ITC se añade 0.1 M NaCl a las disoluciones amortiguadoras. En la Tabla 4.3 se presentan las sustancias utilizadas para la preparación de las disoluciones amortiguadoras.

Tabla 4.3 – Reactivos de las soluciones amortiguadoras utilizadas.

Nombre	Estructura	Marca
Tris-(hidroximetil)-aminometano, **TRIS (pH 7.4-7.5)**		Merck
Bis-(2-hidroximetil)- tris-(hidroximetil)-metano, **Bis-TRIS (pH 6.5)**		Sigma

Las mediciones mediante ESI-MS se han llevado a cabo con disolución amortiguadora de acetato de amonio/ amoníaco 0.02 M a pH 7.4. Como fase móvil se ha usado una disolución 1:9 acetonitrilo (HPLC grade): acetato de amonio (5 mM) a pH 7.5.

Capítulo 5

Procedimientos experimentales

5.1 Valoraciones por polarografía de impulsos diferencial

Las valoraciones polarográficas comienzan colocando en la celda electroquímica un volumen conocido (20 mL) de la disolución amortiguadora: 0.1 M - 0.01 M TRIS (o BIS-TRIS) a pH 6.5 – 7.5 con KNO_3 0.01 M. Seguidamente se desoxigena durante 20 minutos pasando una corriente de nitrógeno por la disolución. A continuación se hace una adición del ión metálico y/o del ligando (para obtener la concentración inicial de $1x10^{-5}$M), o una mezcla de ligandos, dependiendo del tipo de estudio de competición, directa o inversa. A continuación se registra un voltamperograma. Después de comprobar la reproducibilidad del pico y registrar su intensidad y potencial de pico, se realiza la valoración adicionando progresivamente la disolución del ligando o del ión metálico, según el tipo de valoración, a la disolución de la celda. Después de cada adición la disolución se desoxigena durante 60 segundos y se registra el voltamperograma. Todos los voltamperogramas obtenidos se guardan en el disco duro del ordenador, en el formato de señal y en el formato de texto, para luego poder tratarlos en el entorno de Matlab.

Las valoraciones se han llevado a cabo en el modo de polarografía diferencial de impulsos (DPP) y los parámetros han sido los siguientes: amplitud del impulso 0.05 V, tiempo del impulso 0.05 s, tiempo de la gota 1 s.

5.2 Valoraciones por dicroísmo circular

Las medidas de CD se realizaron en los SCT de la UB, donde no existe una salida de nitrógeno que permita la preparación de disoluciones con una atmósfera inerte. Como en estudios anteriores, las medidas se realizaron dentro de un receptáculo del espectropolarimetro 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 una hora, pasando una corriente de nitrógeno. Una vez en los SCT se vierte el volumen necesario de la disolución a valorar en la cubeta de cuarzo (2 mL para un camino óptico de 10 mm), 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 ultimo de ellos en el formato propio del *software* y como *.txt, a fin de abrirlos posteriormente en el entorno Matlab. Las condiciones experimentales de adquisición de datos fueron:

- registro de puntos en intervalos de 0.1 nm;
- anchura de banda de 1 nm;
- tiempo de respuesta de 4 s;
- velocidad de escaneo de 100 nm min^{-1}.

Entonces se añade el volumen requerido de la disolución valorante sin retirar la cubeta del receptáculo de la medida, esto es, mientras la corriente de N_2 mantiene una atmósfera

inerte. Una vez tapada la celda de absorción, 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. Así mismo se procedió a una optimización de las concentraciones empleadas, siguiendo las recomendaciones de una tesis doctoral anterior, para minimizar el efecto de que la absorbancia crezca el mínimo posible a longitudes de onda pequeñas, y se llegue a un valor (λ_{lim}) en el cual no se puede medir correctamente la elipticidad.

5.3 Medidas por espectrometría de masas

Los experimentos de Espectrometría de Masas se han realizado en el modo positivo de ionización de electrospray (ESI-MS). Se preparan las muestras del ión(es) metálico(s), mezclado en varias proporciones con el ligando(s), en un medio de disolución amortiguadora de acetato de amonio/ amoniaco de pH conocido, previamente desoxigenada para evitar la oxidación de los grupos tiol.

Se han inyectado directamente volúmenes de 10 - 50 µL de las muestras. Las condiciones experimentales son las siguientes:

- velocidad de flujo de 0.1 mL/min;
- temperatura de la fuente de ionización de 300°C;
- potencial positivo aplicado al capilar entre 3 y 4 KV;
- potencial del cono entre 150 y 350 V;
- intervalos de registro del espectro (m/z) entre 150 y 2500.

5.4 Valoración isotérmica calorimétrica

Se han llevado a cabo valoraciones calorimétricas isotérmicas directas (adición de metal a ligando) a temperatura de 25°C. En este caso la disolución del ligando (Secyst) se coloca en la celda y se realiza la valoración añadiendo la disolución del ión metálico. Las disoluciones amortiguadores utilizadas para la preparación de las disoluciones de ligandos y de los metales se desoxigenan previamente.

En un experimento típico, se añade un volumen de 10 µL del valorante a la disolución en la celda (300 µL de capacidad que contiene el inyector), con un tiempo entre cada inyección de 240 segundos (si la reacción es lenta las adiciones deben ser de mayor duración). Se han probado varios protocolos experimentales, pero las curvas de las valoraciones para los complejos Hg^{2+}-Secyst son irregulares para determinarlas con precisión mediante ITC. No obstante, se han podido analizar las interacciones y revelar algunas características termodinámicas. Los resultados se presentan en el Capítulo 8 en la parte de discusión de resultados.

Parte III

Resultados y Discusión

Capítulo 6

Complejación competitiva de Cd^{2+} con fragmentos de fitoquelatina de cadena corta mediante DPP–MCR-ALS y ESI-MS: influencia de la longitud de cadena

6.1 Introducción

Este Capítulo engloba tres trabajos que tienen por finalidad estudiar la complejación competitiva entre mezclas de ligandos, como son las fitoquelatinas y/o sus fragmentos en presencia de Cd^{2+} mediante diversas técnicas analíticas complementarias.

Se ha aplicado extensamente la estrategia de emplear las valoraciones voltamperométricas por DPP con un posterior tratamiento de datos mediante MCR-ALS, tanto para las valoraciones individuales como para las matrices combinadas de datos de diversas valoraciones para un mismo sistema. El conjunto de publicaciones muestra cómo el incremento de la complejidad de interpretación de las señales llevó a mejorar el tratamiento de las matrices de datos con nuevas herramientas quimiometricas. Además se ha aplicado el análisis por espectrometría de masas (ESI-MS) que ha permitido obtener la estequiometria de los complejos predominantes en los sistemas estudiados.

Estos trabajos representan la primera aproximación al estudio sistemático de la complejación competitiva de las mezclas de fitoquelatinas y péptidos relacionados en presencia de un catión metálico.

6.2 *Competitive binding of Cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by Multivariate Curve Resolution*

Con el objetivo final de estudiar los procesos de complejación de iones metálicos en presencia de mezclas de fitoquelatínas (PC_n), se eligieron dos fragmentos de PC_n, como la Cisteína (Cys) y la Cisteína-Glicina (Cys-Gly), un aminoácido y un péptido de cadena corta y que contienen en sus estructuras el grupo tiol.

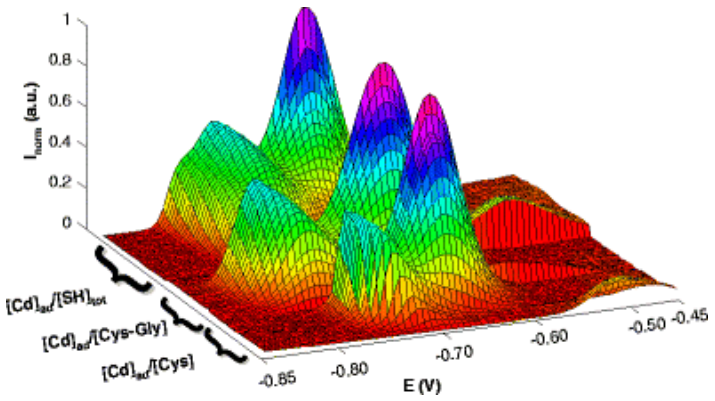
La mayoría de los métodos utilizados para la especiación de PC_n y sus complejos se basan en el uso de la cromatografía y posterior detección de las distintas especies [1,2]. En la situación aquí planteada el objetivo es estudiar la mezcla de ligandos en presencia de un catión citotóxico (Cd^{2+}). La complejación de Cys-Gly con Cd había sido ya anteriormente estudiada con DPP/MCR-ALS [3,4,5] y se propuso la formación de los complejos ML, ML_2 y M_2L_2. En esos estudios se evidenció la presencia de fenómenos que afectan el poder de resolución del MCR-ALS, como son el fuerte solapamiento entre distintas señales y la falta de linealidad de los datos polarograficos. Además se constató un cierto efecto de histéresis entre las valoraciones directas e inversas, una vez que en la valoración directa se observaron los complejos ML y ML_2, mientras que en la valoración inversa fueron los complejos ML_2 y M_2L_2.

El trabajo presentado fue el primer caso en que se aplicó la metodología 'clásica' desarrollada en el grupo de Electroanálisis a una mezcla de ligandos. Anteriormente, se había aplicado el tratamiento MCR-ALS a algunos casos de matrices de datos voltamperométricos de mezclas de dos iones metálicos con un ligando [3,6,7].

Competitive binding of Cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by Multivariate Curve Resolution

Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.

Analytical and Bioanalytical Chemistry, 394(4), 1137 - 1145 (2009)



Anal Bioanal Chem (2009) 394:1137–1145
DOI 10.1007/s00216-009-2791-z

PAPER IN FOREFRONT

Competitive binding of cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by multivariate curve resolution

Rui Gusmão · Cristina Ariño · José Manuel Díaz-Cruz · Miquel Esteban

Received: 12 February 2009 / Revised: 1 April 2009 / Accepted: 2 April 2009 / Published online: 24 April 2009
© Springer-Verlag 2009

Abstract Multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) has been applied to voltammetric data obtained from analysis of the competitive binding of cysteine (Cys) and cysteine–glycine (Cys-Gly) by Cd(II) as a first approach towards mixtures of phytochelatins and related compounds in natural media. From different starting points, the possibilities of formation of mixed complexes and/or displacements between ligands are investigated. Analysis of the resulting unitary voltammograms and concentration profiles of the resolved components by MCR-ALS suggests that the strongest ligand (Cys-Gly) is able to displace the weakest (Cys) from its metal complexes, whereas this does not happen in the opposite direction. On the other hand, no evidence of Cd mixed-ligand complexes was found.

Keywords Plant thiols · Cadmium · Competitive binding · Multivariate curve resolution with alternating least squares · Differential pulse voltammetry · ESI-MS

Introduction

In plants, thiol rich peptides are synthesized for detoxification of selected metal ions, especially heavy metals [1–4]. A detailed knowledge of the metal-binding characteristics of Cys-rich peptides is necessary to clearly understand the roles of these short ligands in heavy-metal detoxification and also for phytoremediation purposes [5–7]—an eco-friendly approach, using plants, for remediation of soils and water contaminated with metals such as zinc, copper, lead, chromium, and cadmium.

Plants are the main group of organisms affected by heavy metals in the soil and have different strategies for uptake, distribution, or redistribution of elements, which allow them to maintain the stability of the inner environment. When heavy metals pass through the cytoplasmic membrane, they can be bound by sulfur-rich compounds—metallothionein-like proteins, reduced glutathione (GSH), and phytochelatins ($(\gamma$-Glu-Cys$)_n$Gly, $n \geq 2$) [7–9]. The GSH structure can be viewed as a building block of other vital amino acids—L-glutamate (Glu), L-cysteine (Cys), and L-glycine (Gly). GSH serves several vital functions, including maintaining the essential thiol status of proteins by preventing oxidation of –SH groups by reducing disulfide bonds induced by oxidative stress; it also scavenges free radicals and provides a reservoir of Cys [10].

Some electrochemical techniques, for example differential pulse polarography (DPP) can be very helpful in the study of these systems. It can be envisaged that different thiols will result in different voltammetric signals, thereby posing the possibility of speciation. The electrochemical reactions of species containing sulfhydryl groups on mercury electrodes provide an important advantage to electrochemical methods in the analysis of a number of biologically significant compounds [11, 12]. Discrimination between thiols and their metal complexes, however, is far from facile with minor shifts in potential effectively precluding voltammetric resolution of the peaks.

The detailed mechanism of anodic reactions of thiol groups on mercury electrodes has been studied by the use of different voltammetric techniques [13–15]. The reactions consist of electro-oxidation of mercury in two separate steps to cysteine mercurous and mercuric thiolates which

R. Gusmão · C. Ariño · J. Manuel Díaz-Cruz · M. Esteban (✉)
Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona,
Martí i Franquès 1–11,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: miquelestebanc@ub.edu

are both strongly adsorbed at the electrode. As a result, several anodic signals are usually obtained in the voltammetric study of metal–thiolate systems. This can cause additional interpretation difficulties when they overlap with characteristics signals of the species considered, although in some cases they enable us to follow the evolution of free thiolate groups.

A valuable improvement of the performance of electrochemical methods is achieved when these are assisted by powerful chemometric tools, such as multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) [16, 17]. Much knowledge has been obtained by these means for systems involving one metal ion plus a unique thiol ligand [18–23]. Although DPP/MCR-ALS may not always enable us to propose structures for the complexes, the stoichiometries deduced from the MCR-ALS concentration profiles provide essential information on complex composition that can be complemented with non-electrochemical techniques, for example circular dichroism [21, 22] or mass spectrometry [20]. Recently, MCR-ALS was applied to voltammetric data obtained in the study of competitive complexation of Zn(II) and Cd(II) by the α and β domains of metallothionein (MT) [18] and different $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{Gly}$ [19, 20]. The complexity of the voltammograms obtained in these titrations prevents their direct interpretation using traditional electrochemical methods, but when MCR-ALS is applied, voltammograms can be interpreted rather satisfactorily in qualitative terms, useful for metal speciation of environmentally relevant natural ligands.

Cysteine-rich peptides have been used for the development of low-cost sensors for detection of different metal species [24–26] and modification of electrode surface [27, 28]. Thus, a simple sensor for determination of Cd(II), Zn(II), and cisplatin was developed by using a modification of the HMDE surface by phytochelatin [24] and metallothionein [25]. A similar approach was proposed for a Pd(II) biosensor [26]. L-Cys self-assembled monolayers were used for electrochemical sensing, by adsorptive stripping analysis of Cu(II) in environmental samples [27]. In addition, these biosensors can be used to analyze heavy metals in human body fluids (blood serum and urine). L-Cysteine methyl ester-modified graphite powder (Cyscarbon) has been tested as a material to remove Pd ions from aqueous media [28]. Determination of Pd ions was performed by adsorptive stripping voltammetry using an Hg nanodroplet array-modified glassy carbon electrode. It was found that 1 g Cyscarbon takes up 60 μmol L^{-1} palladium ions from 25 mL of 100 μmol L^{-1} Pd ion samples.

In this work, the competitive binding of two GSH fragments, Cys and Cys-Gly, by Cd(II) was studied by DPP/MCR-ALS with the objective of developing a model enabling understanding of complexation competition. In subsequent studies these principles can be applied to metal complexes of longer-chain thiols or complexes of ligands with multiple thiol groups. Additionally, the study investigated the possible presence of mixed ligand complexes in a situation where the typical tetrahedral coordination of Cd (II) can be achieved with thiol groups of different peptides. This study can be regarded as a preliminary stage in the analysis of natural extracts in which complex mixtures of both metal ions and thiol peptides are expected.

Experimental

Chemicals and instrumentation

L-Cysteine (free base) and Cys-Gly (fluoroacetate salt) peptides were provided by Sigma; the minimum purity was 98.0 and 85.0% respectively. Stock solutions (1×10^{-3} mol L^{-1}) of the thiol peptides were prepared daily.

All other reagents were analytical-reagent grade from Merck. Cd(II) stock solution was prepared from $Cd(NO_3)_2.4H_2O$ and standardized complexometrically. TRIS-HNO_3 ([tris(hydroxymethyl)aminomethane]–nitric acid) was used as pH 7.5 buffer, and both were used as a supporting electrolyte at 0.1 mol L^{-1} ionic strength.

Polarographic measurements were performed in a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. Working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury-drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.9 mm^2, an Ag/AgCl, KCl (3 mol L^{-1}) electrode, and a glassy carbon electrode, respectively, all from Metrohm. Double-distilled Hg was used.

Unless otherwise indicated, instrumental conditions for DPP experiments were a drop time of 1 s, a scan rate of 5 mV s^{-1}, a pulse time of 0.05 s, and a pulse amplitude of 50 mV.

pH measurements were made with an Orion SA 720 pH-meter. All the experiments were carried out at 25°C and purified nitrogen (Linde N50) was used for solution deaeration.

Positive-ion mode ESI-MS experiments for mixtures containing Cys-Gly and Cd(II) were performed using an Agilent 1100 Q-TOF instrument.

Voltammetric titrations

In each case, 20 mL 10^{-5} mol L^{-1} starting solution was placed in the voltammetric cell at constant ionic strength (0.1 mol L^{-1}) and pH (7.5) to avoid pH and counter ion concentration influences on the complexation. After deaerating with pure N_2 for 20 min, DP polarograms were recorded. Further, successive additions of 10^{-3} mol L^{-1} Cd (II), Cys, or Cys-Gly solution were made and polarograms were again recorded.

Data treatment

Polarograms were smoothed, baseline corrected, and converted into data matrices using home-made software implemented in Matlab [29]. MCR-ALS analysis of data was carried out by use of several software products also implemented in Matlab (some of them available at http://www.ub.edu/mcr/ndownload.htm), following the general methodology described in previous papers [18–23]. In this work, the constraints used were essentially non-negativity and signal-shape.

Electrospray ionization mass spectrometry experiments

In ESI-MS experiments, direct injection of 50 μL sample, in ammonium acetate–ammonium hydroxide buffer, pH 7.5, was carried at a flow rate of 40 μL min^{-1} with a source temperature of 200°C and desolvation temperature of 250°C. The applied voltage was fixed at 2.5 kV, and the cone potential was maintained at 60 V. The mass spectra were collected throughout an *m/z* range from 100 to 1500. Instrument control and mass spectra deconvolution were performed by means of Analyst QS Software. A 1:9 acetonitrile (HPLC grade)–5 mmol L^{-1} ammonium acetate mixture was adjusted to pH 7.5 and used as mobile phase.

Results and discussion

With the objective of predicting the behaviour of a Cd^{2+}–peptide mixture, direct titrations of a Cd^{2+} solution with Cys-Gly and Cys were carried out separately. Figure 1 shows the DPP data matrices obtained in both titrations; it is possible to observe that although Cd^{2+}/Cys signals appear at less negative potentials than those of Cd^{2+}/Cys-Gly both systems have a similar general behaviour. Thus, signals related to Cd complexes can be observed at more negative potentials than −0.64 V, where reduction of free Cd^{2+} appears. At higher potentials, between −0.5 and −0.6 V, wide signals due to the formation of Hg thiolates can be observed [19].

As in previous DPP studies assisted by MCR-ALS analysis [21], four components for the Cd^{2+}/Cys-Gly system were identified (results not shown). Cys-Gly can form two different types of bond with Cd^{2+} that could be attributed to Cd^{2+} bound to one or two sulfur atoms to form complexes with 1:1 and 1:2 stoichiometry, respectively. The remaining components identified were the reduction of free Cd^{2+} ions and the anodic signal of free ligand related to the anodic wave of mercury. At this point it is necessary to remark that MCR-ALS analysis gives information about the number of components responsible for variation of the data matrix, and that in electroanalysis a component is related to an electrochemical process and not necessarily to a chemical species.

For the Cd^{2+}/Cys system the same complexation sequence is proposed (similar MCR-ALS results). Complexes formed appear at less negative reduction potentials than those of Cys-Gly, showing their lower stability. Cys is a segment of Cys-Gly and both have only a thiol group and, therefore, the complexation sequence of Cys and Cys-Gly with Cd is very similar.

The competitive complexation process of Cys and Cys-Gly towards Cd^{2+} was studied by means of DPP titrations of different combinations of the three species. Figure 2a–d show the evolution of the DPP curves when one of the ligands is added to solutions containing partially free and/or bound (to the other ligand) Cd^{2+}. In case a), Cys was added to 1:1 Cd^{2+}:Cys-Gly solution. Initially, Cd^{2+} ions are chelated by Cys-Gly, as the absence of a free Cd^{2+} reduction peak at −0.64 V indicates (Fig. 2a). The signal at −0.78 V denotes the presence of Cd-Cys-Gly complexes, probably in the form of ML and ML_2; this signal does not change with successive additions of Cys as would be expected, because of the greater stability of Cd-Cys-Gly complexes. The increase of the signal at less negative potentials was the only change observed in these voltammograms. This signal is related to the anodic oxidation of Hg in the presence of free Cys.

When Cys-Gly is added to 1:1 Cd^{2+}:Cys solution, a decrease of the Cd-Cys signals combined with the appearance of a shoulder at more negative potentials was observed (Fig. 2b). With further additions of Cys-Gly, this shoulder develops into a very well defined signal at the end of the titration. Simultaneously an increase of the anodic oxidation of Hg signal at less negative potentials takes place. In this case, Cys-Gly displaces Cys of the Cd complexes giving the more stable complexes.

In the third case (Fig. 2c), when Cys-Gly was added to a 2:1 Cd^{2+}:Cys solution, free Cd^{2+} and Cd-Cys complexes are initially present giving two overlapping peaks. Successive additions of Cys-Gly cause a decrease of these signals and the increase of the peak corresponding to Cd/Cys-Gly complexes (at −0.80 V) together with the characteristic wide signals of the ligands (at $-0.6 < E < -0.5$ V), in a similar way to the situation described in Fig. 2b.

An analogous situation was also studied, in which Cys was added to a 2:1 Cd:Cys-Gly system; that situation implies the formation of the ML complex (Fig. 2d). Successive additions of Cys cause depletion of the free Cd^{2+} and the formation of successive complexes with Cys, that coexist with the Cd-Cys-Gly previously formed. At the end of the titration, an intense and asymmetric peak related to the presence of Cd/Cys and Cd/Cys-Gly complexes is observed, and the characteristic anodic oxidation signal of Hg because of the presence of the ligands (at $-0.6 < E < -0.5$ V).

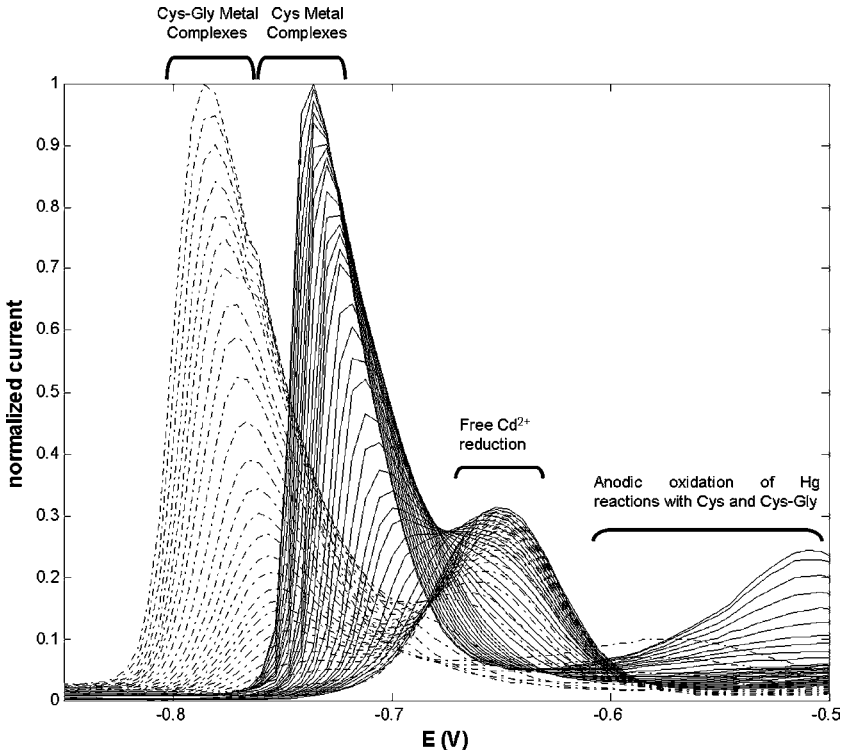


Fig. 1 DP polarograms measured during independent titrations of a solution containing 1×10^{-5} mol L^{-1} Cd^{2+} with successive aliquots of cysteine (*continuous line*) or Cys-Gly (*dot–dashed line*) at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer in the presence of 0.1 mol L^{-1} KNO_3

In order to analyze all these data (Figs. 2a–d) by MCR-ALS, an initial estimate of unitary voltammograms or concentration profiles is necessary for the iterative ALS optimization. The unitary voltammograms obtained in the MCR-ALS analysis of data in Fig. 1 have been chosen for that purpose, and they are represented in Fig. 2e. Six components were necessary for proper resolution of the data in Fig. 1. Some, or all, of them are present in the different titration experiments (Fig. 2a–d). The constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal shape (for the voltammograms of all species) were applied. The MCR-ALS iterative process yielded unitary signals almost identical with those used as initial estimates, and shown in Fig. 2e, and the concentration profiles shown in Fig. 3, with lack of fit of ca. 13% in all cases. Comparison of Fig. 2a–d with the individual voltammograms of Fig. 2e, corresponding to the estimate of components which are valid for the four different experiments, indicates the competitive behaviour of both ligands on Cd complexation. Although there is a slight difference in the position of the anodic oxidation peak of Hg in the presence of both peptides, for the sake of simplicity, and taking into account the widths of these signals, it is considered that the first component at −0.52 V represents the evolution of both fragments. Component 2 correlates with the reduction of free Cd^{2+} ions at −0.64 V. The reduction of the Cd^{2+} bound to Cys is shown by the presence of components 3 (ML, E_p=−0.71 V) and 4 (ML_2, E_p=−0.74 V). Similarly, in the case of Cys-Gly, Cd^{2+} can be bound to one sulfur atom to produce component 5 (ML, E_p=−0.76 V) or to two sulfur atoms to form component 6 (ML_2, E_p=−0.78 V).

The best MCR-ALS results for the data matrix shown in Fig. 2a (12.95% lack of fit) are the concentration profiles shown in Fig. 3a, evidence that the only appreciable change throughout Cys additions is the increment of component 1, showing that Cys does not have the ability to capture Cd^{2+} from the Cd-Cys-Gly complexes, because of the greater stability of these complexes (detected at more negative potentials).

The best MCR-ALS analysis of the data matrix in Fig. 2b (11.74% lack of fit) provides a concentrations profile (Fig. 3b) showing that components 3 and 4 (Cd/Cys complexes) suffer a drastic decrease from the first addition of Cys-Gly. Parallel to this, component 5 increases and reaches a maximum at ratios close to 1.0 (i.e., when there is one sulfur atom per Cd^{2+} ion) indicating the complete substitution of Cys molecules by Cys-Gly from the complex. This behaviour also suggests that no mixed complexes are formed. At ratios higher than 1, component 6 appears and starts to increase. This is because of the great amount of Cys-Gly in solution, and the formation of the 1:2 Cd-Cys-Gly complex. A parallel increase in component 1 is also observed, because of the evolution of both free fragments.

For the data matrix in Fig. 2c, the best MCR-ALS results (13.57% lack of fit) were obtained by assuming the additional restriction of the absence of the free peptides

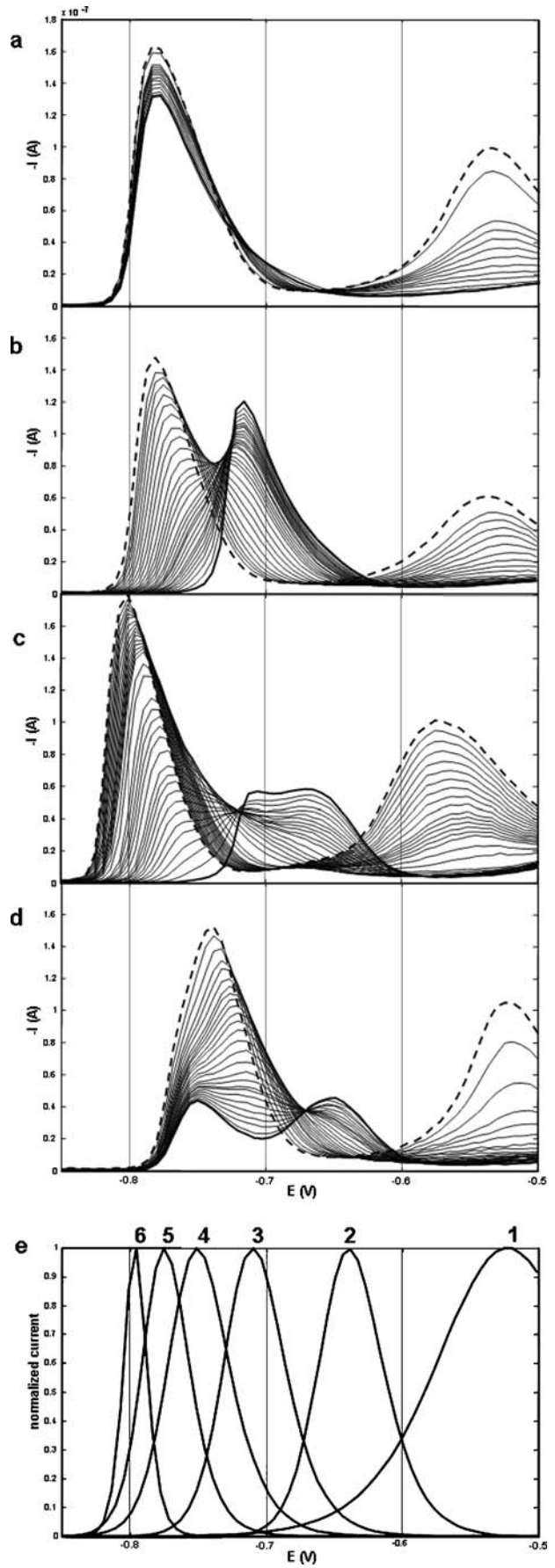


Fig. 2 DP polarograms measured during the titrations of: a solution containing 1×10^{-5} mol L^{-1} of both Cys-Gly and Cd^{2+} with successive aliquots of Cys (**a**); a 1×10^{-5} mol L^{-1} solution of both Cys and Cd^{2+} with successive aliquots of Cys-Gly (**b**); a 1×10^{-5} mol L^{-1} Cd^{2+}–0.5×10^{-5} mol L^{-1} Cys solution with successive aliquots of Cys-Gly (**c**); a 1×10^{-5} mol L^{-1} Cd^{2+}–0.5×10^{-5} mol L^{-1} Cys-Gly solution with successive aliquots of Cys (**d**). Normalized pure voltammograms obtained in MCR-ALS analysis of the data matrices in Fig. 1, that will be used as an initial estimate for MCR-ALS resolution of the data in Fig. 2a–d (**e**). For each experiment, the first (*continuous line*) and last (*dashed line*) voltammograms are drawn in *bold*. All experiments were performed at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer, in the presence of 0.1 mol L^{-1} KNO_3. In Fig. 2e, components are due to: Cys/Cys-Gly (*1*), Cd^{2+} ion (*2*), Cd(Cys) (*3*), $Cd(Cys)_2$ (*4*), Cd(Cys-Gly) (*5*), and $Cd(Cys\text{-}Gly)_2$ (*6*)

and Cd/Cys-Gly complex signals at the beginning of the titration. The concentrations profile (Fig. 3c) supports the fact that with sequential addition of Cys-Gly this longer chain peptide binds the free Cd^{2+} ions (component 2), simultaneously being able to bind Cd^{2+} ions that were complexed with Cys (component 3). In addition, component 2 (free Cd^{2+}) suffers a more drastic decrease than component 3, evidence that Cys-Gly binds more easily to free Cd^{2+} than to the ions already complexed with Cys, giving complexes (components 5 and 6) at more negative potentials (first ML and later ML_2). Component 5 increases, achieving a maximum at a Cys-Gly-to-metal ratio of 1.0, indicating the formation of a 1:1 complex; later, at ratios higher than 1, component 6 (associated with the $Cd(Cys\text{-}Gly)_2$ complex) and the anodic signal (component 1) appear. The behaviour observed in Fig. 2b and c is very consistent, indicating the trend of Cys-Gly to capture Cd^{2+} ions present in solution to yield 1:1 and 1:2 complexes.

The concentration profiles obtained from MCR-ALS analysis of the data in Fig. 2d (Fig. 3d; 13.55% lack of fit) evidence that Cys binds the free Cd^{2+} ions (component 2), giving, successively, the ML and ML_2 complexes (components 3 and 4, respectively), at less negative potentials than the initially present Cd-Cys-Gly complex (component 5). Once again, the added Cys did not have the capability to capture the Cd^{2+} ions chelated by Cys-Gly. The signal of the corresponding component 5 is stable throughout the additions.

As stated before in the text, a major objective of this study was better prediction of the behaviour of a system under metal ion stress or contamination. This situation would correspond to a titration of a mixture of ligands with the metal ion, that is initially absent from the solution. Thus, successive aliquots of Cd^{2+} ion were added to a mixture of Cys and Cys-Gly (at 2:1 ratio), and the results compared with these from the individual titrations of Cys and Cys-Gly with Cd^{2+} ion (Fig. 4). This situation can be considered as a simulation of a real contamination case of a natural system by Cd^{2+} ions.

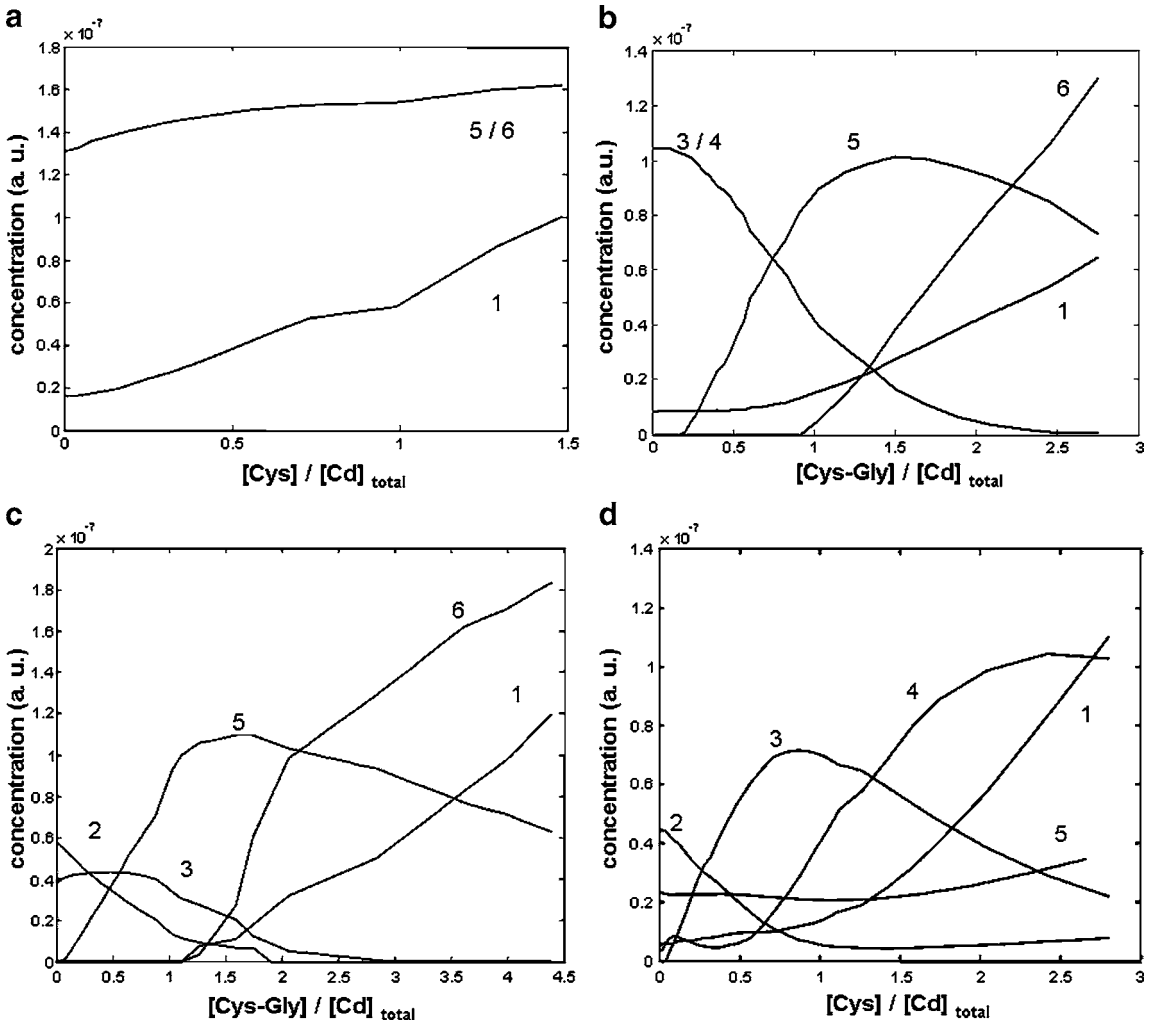


Fig. 3 Respective concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of the data matrices shown in Fig. 2a–d. Applied constraints were non-negativity and signal shape. The concentration profiles are plotted as a function of the added ligand-to-total cadmium concentration ratios. Components are: Cys/Cys-Gly (*1*), Cd^{2+} ion (*2*), Cd(Cys) (*3*), $Cd(Cys)_2$ (*4*), Cd(Cys-Gly) (*5*), and $Cd(Cys\text{-}Gly)_2$ (*6*)

A rapid analysis of the individual matrices corresponding to reverse titrations (Fig. 4a and b) shows that the evolution of the signals are very similar, reinforcing the idea of greater stability of Cd-Cys-Gly complexes when compared with those formed between Cd and Cys. As in the direct titrations (Fig. 1), the Cd^{2+} reduction peak (E_p=−0.64 V) is the only common signal to both cases. Once again, the complexes of Cd^{2+}/Cys-Gly (at $-0.8 < E < -0.75$ V) have a more negative reduction potential than the Cd^{2+}/Cys complexes (at $-0.74 < E < -0.70$ V). The characteristic anodic oxidation of Hg signal in the presence of the ligands occurs inside a less negative potential range (at $-0.6 < E < -0.45$ V).

Successive additions of Cd to a mixture of Cys and Cys-Gly (at 2:1 ratio), as shown in Fig. 4b, clearly produces three wide signals. One corresponds to the Cd^{2+} reduction that is common to the data matrices in Fig. 4a and b. Another signal corresponds to the anodic oxidation of Hg in the presence of the ligands, that in this case appears as a unique overlapping signal ($-0.6 < E < -0.45$ V). At potentials between −0.7 and −0.8 V a very broad signal is observed; this corresponds to the overlapping peaks of the different complexes formed with both ligands. To identify which species are responsible for the evolution of the signals, combined analysis by MCR-ALS of matrices in Fig. 4a and b was performed. From this analysis the normalized pure voltammograms (Fig. 4c) and concentration profiles (Fig. 5a–c) were obtained.

Identification of free Cd^{2+} (component 3) and free ligands (components 1 and 2) by MCR-ALS analysis is clear. In contrast, assignment of the signals related to bound Cd^{2+} seemed to be ambiguous, and unsatisfactory results were obtained if only data shown in Fig. 4b are considered. For this reason, MCR-ALS was applied to the column-wise combined matrix following the data treatment explained

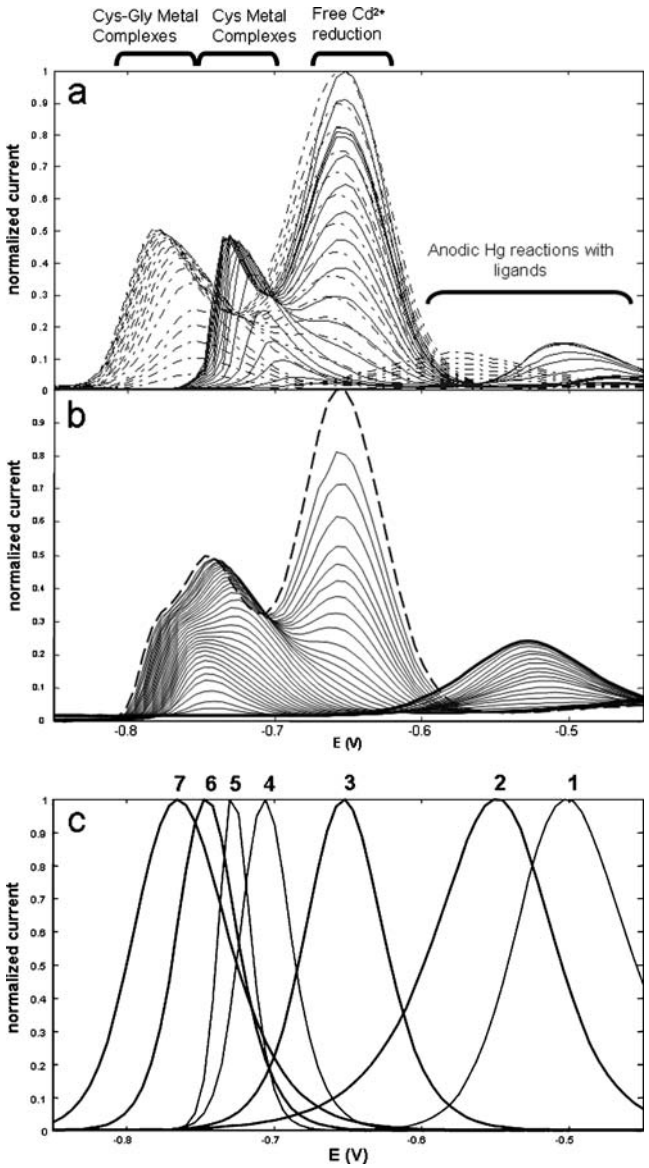


Fig. 4 (**a**) DP polarograms measured during independent titrations of 1×10^{-5} mol L^{-1} Cys (*continuous line*) or 1×10^{-5} mol L^{-1} Cys-Gly (*dot–dashed line*) solutions with successive aliquots of Cd^{2+}. (**b**) DP polarograms measured during the titration of a solution containing 0.5×10^{-5} mol L^{-1} Cys-Gly and 1×10^{-5} mol L^{-1} Cys with successive aliquots of Cd^{2+}. First (*continuous line*) and last (*dashed line*) voltammograms are in *bold*. All experiments were performed at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer in the presence of 0.1 mol L^{-1} KNO_3. (**c**) Normalized pure voltammograms obtained from MCR-ALS analysis of the combined matrices of the data in Fig. 4a and b. Components are due to: Cys (*1*), Cys-Gly (*2*), Cd^{2+} ion (*3*), $Cd(Cys)_2$ (*4*), $Cd_2(Cys)_2$ (*5*), $Cd(Cys\text{-}Gly)_2$ (*6*), and $Cd_2(Cys\text{-}Gly)_2$ (*7*)

elsewhere [18]. The most realistic results were obtained by assuming seven (peak-shaped electrochemical) components and applying the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal shape. In the MCR-ALS solution, pure voltammetric signals are common to the experiments (Fig. 4c). It was considered that the first two components, at −0.51 V and −0.55 V represent evolution of Cys and Cys-Gly, respectively. Component 3 correlates with the free Cd^{2+} ions at −0.65 V. Components 4 and 5 are necessary to explain the evolution of the reduction of the Cd^{2+} bound to Cys, and components 6 and 7 are necessary to explain the evolution of the reduction of the Cd^{2+} bound to Cys-Gly.

Figure 5a–c summarizes the results obtained for the concentration profiles, with lacks of fit of ca. 10%. At this point, it is important to emphasize the resolving ability of MCR-ALS in the simultaneous analysis (column-wise augmented matrix) of the data obtained with the three titration

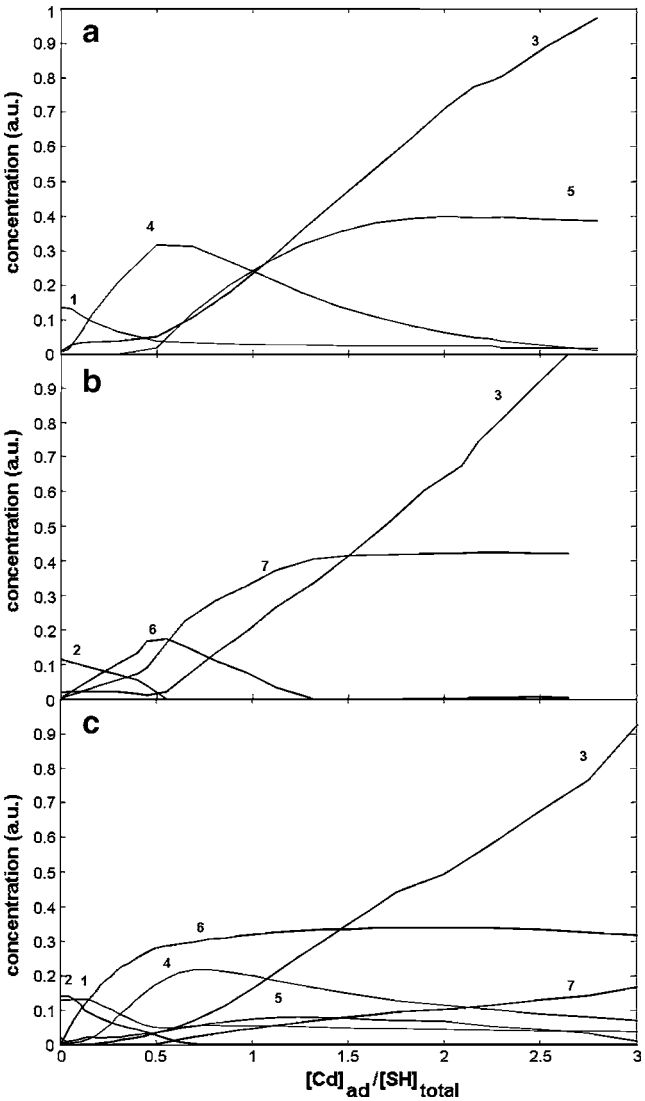


Fig. 5 Concentration profiles obtained by MCR-ALS from titration of: (**a**) Cys by Cd^{2+} (*continuous curves*, Fig. 4a); (**b**) Cys–Gly by Cd^{2+} (*dashed line curves,* Fig. 4a); (**c**) Cys:Cys–Gly (at 2:1 ratio) by Cd^{2+} (Fig. 4b). All profiles are plotted as functions of the added Cd-to-total thiol concentration ratios. Components are due to: Cys (*1*), Cys-Gly (*2*), Cd^{2+} ion (*3*), $Cd(Cys)_2$ (*4*), $Cd_2(Cys)_2$ (*5*), $Cd(Cys\text{-}Gly)_2$ (*6*), $Cd_2(Cys\text{-}Gly)_2$ (*7*)

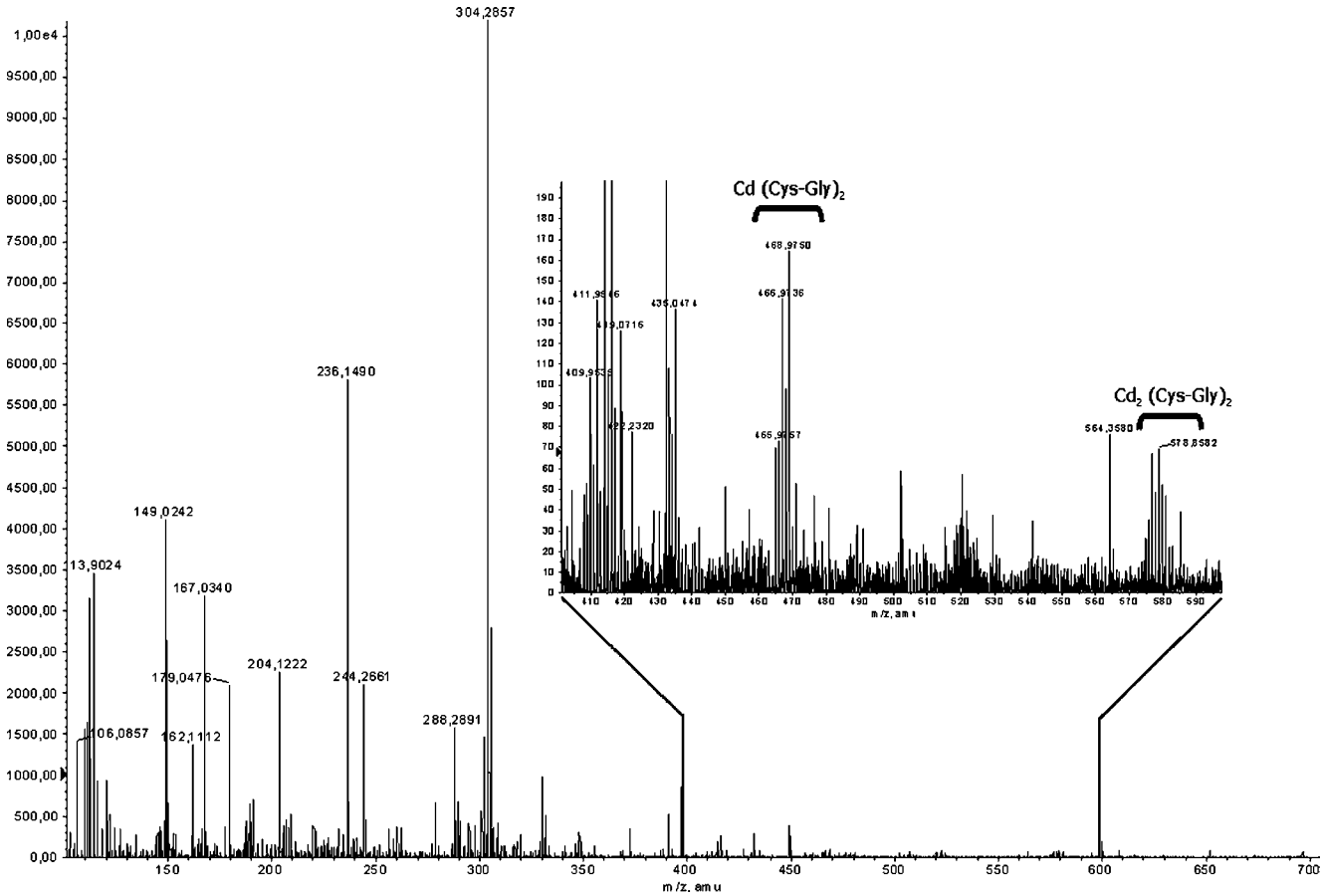


Fig. 6 ESI-MS spectrum obtained from 5×10^{-5} mol L^{-1} Cd^{2+}–2.5×10^{-5} mol L^{-1} Cys-Gly solution in ammonium acetate–ammonium hydroxide buffer at pH 7.5

schemes, in the presence of a high number of components and polarograms with highly overlapping signals.

From the reverse titrations of individual ligands with Cd^{2+} (Fig. 4a) the concentrations profiles have been obtained by MCR-ALS (Fig. 5a and b). These results confirm previous data that have been discussed elsewhere [21, 23]; here they are only used for comparison purposes. Nevertheless, it is interesting to remark that in both cases, once the 1:2 stoichiometry has been reached at a 0.5 Cd-to-peptide ratio, the additional Cd^{2+} ions are free (component 3 starts to increase) and the signals of the ML_2 complexes (components 4 and 6) are gradually replaced by new signals at more negative potentials (components 5 and 7, respectively). This is not consistent with the formation of 1:1 ML complexes, whose reduction signals should be placed at more positive potentials than the ML_2 complexes.

Among the possible alternative explanations (e.g. changes in the electrochemical reversibility, electrode adsorption, etc.) formation of a M_2L_2 complex as a consequence of the weak binding of a second Cd^{2+} ion into a previously existing ML_2 complex must be considered. Such a weak interaction could be established with the carboxylate or amino groups, producing stabilization of other Cd^{2+} ions strongly bound to the sulfur atoms. Consequently, reduction of the Cd^{2+} ions present in the M_2L_2 complex could produce two well-differenced signals—one very close to that of free Cd(II) that could be included in the same component 3 and a second at potentials slightly more negative than in the ML_2 complex. This hypothesis seems to be quite reasonable, as proved by the presence of the species ML_2 and M_2L_2 in the ESI-MS spectra of a 2:1 mixture of Cd^{2+} and Cys-Gly (Fig. 6).

From the concentration profiles of the titration of a 2:1 Cys:Cys-Gly mixture with Cd^{2+} (Fig. 5c), it is possible to confirm that although Cys is present at double concentration, most of the Cd^{2+} ions are bound to the longer chain peptide (Cys-Gly). MCR-ALS analysis enabled discrimination of the anodic signals related to both ligands (components 1 and 2), giving the possibility of knowing to which ligand Cd^{2+} binds preferentially.

When Cd^{2+} ion is added to the mixed peptides solution, the relative excess of Cys-Gly relative to Cd^{2+} ion enables the formation of bonds with two sulfur atoms, component

6, which stabilizes at Cd-SH ratios close to 0.5. At the same ratio, component 1 (anodic signal related to Cys-Gly) disappears. A parallel increase of component 7 at more negative potential is observed. Because of its behaviour, as previously stated, component 7 could be reduction of a new Cd/Cys-Gly complex, or whatever, including a loss of linearity of the electrochemical response (because of loss of reversibility or electrode adsorption effects). 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 7.5.

In the case of the complexes formed with Cys, as expected, the $CdCys_2$ complex was observed (component 4), although it has its maximum growth at slightly higher ratios than those for the complexes formed between Cd^{2+} and Cys-Gly. The same explanation used for component 7 can be used for component 5. Again, it must be remembered that in polarographic techniques, a signal, and therefore a component, is directly associated with an electrochemical process [16].

A difference observed between the behaviour of the Cd/Cys and Cd/Cys-Gly complexes in the mixture is the fact that the signals of the complexes formed with Cys have a tendency to diminish. Furthermore, the component of the anodic signal related to Cys (1) never reaches null value and stabilizes at higher Cd-to-thiol ratios in solution. This is a direct consequence of the competitive binding phenomenon that promotes the formation of complexes with the longer chain peptide.

Conclusions

From the combination of DPP and MCR-ALS, valuable information about the competition between different thiol-peptides for heavy metal binding can be obtained. This can be very useful in further studies of natural samples containing a mixture of phytochelatins of different sizes and related peptides. In the model considered here:

1. no evidence of mixed ligand complexes has been found; and
2. rapid exchange equilibrium of the metal among the different ligands was observed, because the short time between consecutive additions proved to be sufficient to displace the metal in order to form the complexes that a priori appeared to be more stable.

Acknowledgements The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2006-14385-CO2-01). Rui Gusmão thanks the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for his Ph.D. grant (BES-2007-15385).

References

1. Grill E, Winnacker EL, Zenk MH (1985) Science 230:674
2. Rauser WE (1990) Annu Rev Biochem 59:61
3. Zenk MH (1996) Gene 179:21
4. Salt DE, Rauser WE (1995) Plant Physiol 107:1293
5. McCutcheon SC, Schnoor JL (2003) Phytoremediation: Transformation and Control of Contaminants. John Wiley & Sons, New York
6. Raskin I, Ensley BD (2000) Phytoremediation of Toxic Metals: Using Plants to Clean Up the Environment. John Wiley & Sons, New York
7. Suresh B, Ravishankar GA (2004) Crit Rev Biotechnol 24:97
8. Supalkova V, Huska D, Diopan V, Hanustiak P, Zitka O, Stejskal K, Baloun J, Pikula J, Havel L, Zehnalek J, Adam V, Trnkova L, Beklova M, Kizek R (2007) Sensors 7:932
9. Pilon-Smits E (2005) Annu Rev Plant Biol. 56:15
10. Cobbett C, Goldsbough P (2002) Annu Rev Plant Biol. 53:159
11. White PC, Lawrence NS, Davis J, Compton RG (2002) Electroanalysis 14:89
12. Kruusma J, Benham AM, Williams JAG, Kataky R (2006) Analyst 131:459
13. Heyrovský M, Mader P, Vavricka S, Veselá V, Fedurco M (1997) J Electroanal Chem. 430:103
14. Mladenov M, Mircesk V, Gjorgoski I, Jordanosk B (2004) Bioelectrochemistry 65:69
15. Yamamoto M, Charoenraks T, Pan-Hou H, Nakano A, Apilux A, Tabata M (2007) Chemosphere 69:534
16. Esteban M, Ariño C, Díaz-Cruz JM (2006) Trends Anal Chem 25:86
17. Ni Y, Kokot S (2008) Anal Chim Acta 626:30
18. López MJ, Ariño C, Díaz-Cruz S, Díaz-Cruz JM, Tauler R, Esteban M (2003) Environ Sci Technol 37:5609
19. Cruz BH, Díaz-Cruz JM, Ariño C, Esteban M (2005) Environ Sci Technol 39:778
20. Chekmeneva E, Díaz-Cruz JM, Ariño C, Esteban M (2007) Electroanalysis 19:310
21. Alberich A, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2007) Anal Chim Acta 584:403
22. Alberich A, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2008) Analyst 133:470
23. Garrigosa AM, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2008) Anal Bioanal Chem 391:2209
24. Adam V, Zehnalek J, Petrlova J, Potesil D, Sures B, Trnkova L, Jelen F, Vitecek J, Kizek R (2005) Sensors 5:70
25. Adam V, Petrlova J, Potesil D, Zehnalek J, Sures B, Trnkova L, Jelen F, Kizek R (2005) Electroanalysis 17:1649
26. Adam V, Hanustiak P, Krizkova S, Beklova M, Zehnalek J, Trnkova L, Horna A, Sures B, Kizek R (2007) Electroanalysis 19:1909
27. Yang W, Gooding JJ, Hibbert DB (2001) J. Electroanal. Chem. 516:10
28. Abiman P, Wildgoose GG, Crossley A, Compton RG (2008) J Mater Chem 18:3948
29. The MathWorks (2006) MATLAB version 7.3.0.267. The MathWorks, Natick

6.3 *Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry*

Este trabajo representa un paso más en el estudio de las mezclas de fitoquelatinas y ligandos con múltiples tioles. La complejación del Cd^{2+} se estudió en sistemas de mezclas de una PC_n (con múltiples tioles) y a uno de sus fragmentos, con un único grupo tiol. En el primer caso se estudió Cys-Gly y PC_2 y en el segundo Cys y PC_3. La estequiometria de los complejos formados se estudió además por ESI-MS. Nuestro principal interés fue seguir el desplazamiento en los procesos de competición del Cd^{2+} por los ligandos. Las mezclas de ligandos fueron escogidas de modo que pudiesen dar lugar a la formación de complejos mixtos, o sea, que fácilmente pudiera cumplir la coordinación tetraédrica del ión cadmio (cuatro grupos tioles). *A priori*, el sistema Cys/PC_3 es más favorable a que esto ocurra que Cys-Gly talvez con una cadena demasiado larga para que el Cd esté simultáneamente enlazado a Cys-Gly y PC_2.

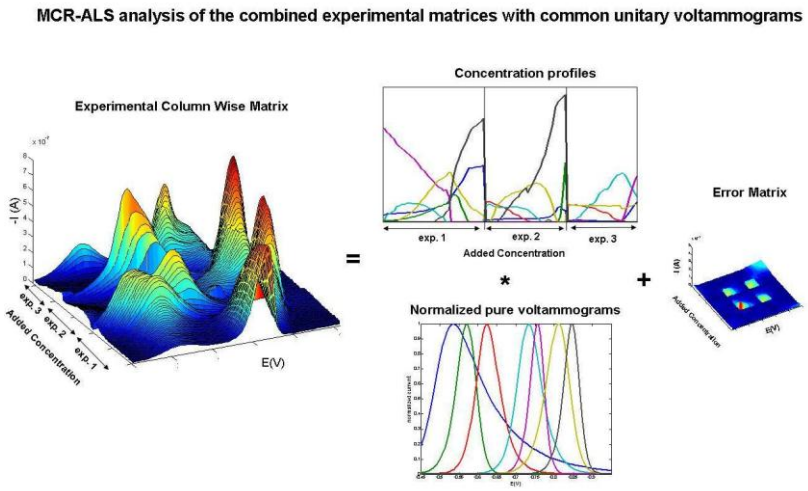
En el presente trabajo, para llegar a una resolución satisfactoria de los sistemas, fue necesaria la aplicación previa del programa *shiftfit* [8] en algunas de las matrices de datos debido al elevado solapamiento entre las señales anódicas de los ligandos y las señales de los complejos. Como se mencionó en el Capítulo 3.5, este programa permite la corrección del desplazamiento de potenciales.

Se comprobó si los principios establecidos para el sistema de ligandos con un solo tiol, Cys y Cys-Gly (ver el apartado 6.2), se pueden aplicar a los casos de mezclas de un ligando con un grupo tiol (Cys y Cys-Gly) y un ligando de múltiples tioles (PC_2 y PC_3) en presencia de Cd^{2+}.

Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry

Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.

The Analyst, 135(1), 86 - 95 (2010)



View Online / Journal Homepage / Table of Contents for this issue

Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: A voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry

Rui Gusmão, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz and Miquel Esteban*

Received 4th September 2009, Accepted 4th November 2009
First published as an Advance Article on the web 13th November 2009
DOI: 10.1039/b918293d

Phytochelatins (PC_n, $(\gamma\text{-Glu-Cys})_nGly$) are cysteine-rich peptides synthesized by plants which are involved in metal bioregulation and phytoremediation. Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares (MCR-ALS) is applied to voltammetric data obtained from the analysis of the competitive binding of Cys or Cys-Gly with PC_2 or PC_3 by Cd^{2+}. The displacements between ligands, the chain length dependence on the competitive binding to PC_n and the possible existence of mixed ligand metal-complexes are investigated. The shape analysis of the resulting pure voltammograms and concentration profiles of the components resolved by MCR-ALS suggests that ligands containing more thiol groups are able to displace the shorter chain ligands from their metal complexes, whereas the opposite does not happen. Electrochemical results are compared with ESI-MS measurements.

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

1. Introduction

Nonessential heavy metal ions (*e.g.* Cd^{2+}) are highly reactive and consequently can be toxic to living cells,[1] leading to deregulation of cell cycle patterns. In the majority of cases Cd induces damage involving free radical generation that alters mitochondrial integrity and triggers apoptosis (programmed cell death).[2,3] Thus plants, like other living organisms, have developed a variety of mechanisms that control and respond to the uptake and accumulation of both essential and nonessential heavy metals. These mechanisms include the chelation and sequestration of heavy metals by particular ligands. The two best characterized heavy metal-binding ligands in living cells are the phytochelatins (PC_n) and metallothioneins (MT).[3]

PC_n consists of three aminoacids, *viz.* cysteine, glycine and glutamic acid, arranged in a $(\gamma\text{-GluCys})_n\text{-Gly}$ conformation, where n is generally in the range of 2 to 6.[4] PC_n, as well as glutathione (γ-Glu-Cys-Gly, GSH), its precursor in the biosynthetic pathway, and other Cys-rich fragments (*e.g.* Cys-Gly), are capable of binding metal ions, mainly *via* thiolate coordination, and the resulting complexes may be stored in the vacuole or exported to the shoot *via* the xylem.[5,6] This is one of the possible mechanisms through which plants can clean up and restore damaged ecosystems, the basis of phytoremediation approaches[3,7,8] – a subject that has gained great interest with the possibility of using transgenic plants.[9,10]

In Cd-PC_n systems, Cd can bind one, two, three or, at maximum capacity, four sulfurs from either single or multiple PC_n molecules.[11] However, the sequence of formation and the final stoichiometry of the different PC_n–metal complexes involved remain largely unknown. For this reason, it is of great interest to study the complexation mechanisms in order to understand and optimise processes of phytoremediation. Several analytical approaches have been developed: atomic absorption spectrometry (AAS),[12] atomic fluorescence spectrometry (AFS),[13] and inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS)[14] are frequently used for the screening and quantification of Cd-containing fractions. Electrospray ionization-mass spectrometry (ESI-MS),[15–17] circular dichroism spectroscopy (CD)[18] and nuclear magnetic resonance (NMR)[19] have also been used for the structural identification of the heavy metal complexes of Cys-rich peptides.

Polarographic and voltammetric techniques, especially in pulse mode, have proved to be a powerful tool to obtain information on physico-chemical properties of heavy metal complexes with PC_n or GSH,[20–22] since they provide different signals for the free peptide, the free metal ion and the bound metal in different chemical environments, and also allow for direct detection of thiols.[23–26] The detailed mechanism of anodic reactions of thiol groups on mercury electrodes has been described by the use of different voltammetric techniques.[24–26] The reactions consist of electro-oxidation of mercury in two separate steps to mercurous and mercuric thiolates which are both strongly adsorbed at the electrode. As a result, several anodic signals are usually obtained in the voltammetric study of metal-thiolate systems. This can cause additional interpretation difficulties when they overlap with characteristic signals of the considered species, although in some cases they allow us to follow the evolution of free thiolate groups. Discrimination between thiols and their metal complexes, therefore, is far from facile with minor shifts in potential effectively preventing voltammetric resolution of the peaks.

A valuable improvement of electrochemical methods is achieved when these are assisted by powerful chemometrical tools, such as Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares (MCR-ALS).[27–30] The use of chemometrics in electroanalytical chemistry is not as popular as in spectroscopy,[31] although recently the application of these methods for mathematical resolution of overlapping signals, calibration and model

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1 - 11, E - 08028 Barcelona, Spain. E-mail: miquelestebanc@ub.edu; Fax: +34 93 402 12 33; Tel: +34 93 403 91 17

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

identification has increased.[29,30] The implementation of new restrictions such as peak shape, and more recently, signal shift correction,[32] adapted to the special character of electrochemical signals, has allowed the resolution of quite intricate metal complex systems.

A great deal of knowledge has been obtained by these means for systems involving one metal ion plus a unique ligand,[33–39] among which Cys-rich peptides[33,34,39] and PC_n[35–39] are included. Although differential pulse polarography (DPP)/MCR-ALS may not always allow us to propose structures for the complexes, the stoichiometries deduced from the MCR-ALS concentration profiles provide essential information on the composition of complexes that can be complemented with non-electrochemical techniques such as ESI-MS[37,39] or isothermal titration calorimetry (ITC).[37] Another strategy to solve some uncertainties is the simultaneous MCR-ALS analysis of a data matrix containing the experiments carried out under the same conditions by different techniques such as, for instance DPP and CD.[38] The complexity of the voltammograms obtained in these titrations prevents their direct interpretation using traditional electrochemical methods. But when MCR-ALS is applied, voltammograms can be interpreted rather satisfactorily, which makes them useful for the metal speciation of environmentally relevant natural ligands.

In a previous paper,[39] the competition between two different GSH fragments (Cys and Cys-Gly) for heavy metal binding was investigated, using the combination of DPP and MCR-ALS. In that study two general conclusions were reached: i) no evidence of formation of mixed ligand complexes was found, and ii) a fast exchange equilibrium of the metal among the different ligands was observed, since the short time between consecutive additions proved to be sufficient to displace the metal in order to form the complexes that *a priori* appeared to be more stable.

In the present work, the competitive binding of Cd^{2+} towards systems consisting of PC_n and one of its fragments is studied by DPP/MCR-ALS: i) Cys-Gly and PC_2; ii) Cys and PC_3. Fig. 1 summarizes the structure of all these peptides. In the previous paper, the study of the competitive binding was made with two GSH fragments with one thiol group. Here, the competitive binding of Cd is made between Cys-rich peptides (of different chain length) with a single thiol group and a PC_n ($n = 2,3$), with an increasing number of thiol groups. In this study the displacements between ligands and the dependence of chain length on the transfer of the metal ion to PC_n are analyzed. Additionally, the possibility of formation of mixed ligand metal-complexes, due to the typical tetrahedral coordination of Cd^{2+} that can be achieved with thiol groups of different peptides, is investigated.

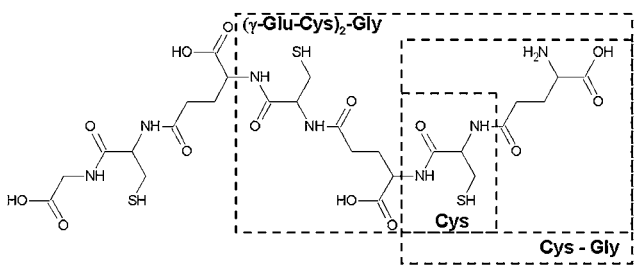


Fig. 1 PC_3 structure with the studied fragments highlighted (Cys, Cys-Gly and PC_2).

2. Experimental

2.1 Experimental and instrumentation

L-Cysteine (free base) and Cys-Gly (fluoroacetate salt) were provided by Sigma with a minimum purity of 98.0 and 85.0% respectively. The phytochelatins $(\gamma\text{-Glu–Cys})_n\text{-Gly}$ ($n = 2,3$), as trifluoroacetate salts, were provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity ranging from 96.9% to 99.0%. Stock solutions (1 mL) of 1×10^{-3} mol L^{-1} thiol peptides were prepared daily. To ensure homogeneity, peptide solutions were mixed at 1400 rpm for 1 min using Eppendorf Mixmate.

All other reagents were analytical-reagent grade from Merck. Cd^{2+} stock solution was prepared from $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ and standardized complexometrically. TRIS-HNO_3 ([tris(hydroximethyl)aminomethane]-nitric acid) was used as pH 7.5 buffer, and KNO_3 was used as a supporting electrolyte at 0.1 mol L^{-1} to set ionic strength.

Polarographic measurements were performed in a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. Working, reference and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.9 mm^2, an Ag/AgCl, KCl (3 mol L^{-1}), and a glassy carbon respectively, all of them from Metrohm. Double distilled Hg was used.

Instrumental parameters for DPP experiments were a drop time of 1 s, scan rate of 0.005 V s^{-1}, pulse time of 0.05 s, and pulse amplitude of 50 mV.

Positive-mode ESI-MS experiments for mixtures of Cd^{2+} with Cys-Gly and PC_2, or Cys and PC_3, were performed using a Q-TOF Agilent 1100 instrument.

pH measurements were made with an Orion SA 720 pH-meter. All the experiments were carried out at 25 °C and purified nitrogen was used for solution deaeration.

2.2 Procedures

Voltammetric titrations. In each case, 20 mL of a 10^{-5} mol L^{-1} starting solution were placed in the voltammetric cell at a constant ionic strength (0.1 mol L^{-1}) and pH (7.5) to avoid pH and counter ion concentration influences in the complexation. After deaerating with pure N_2 for 20 min, DP polarograms were recorded. Successive additions of a 10^{-3} mol L^{-1} Cd^{2+} or peptide solution were made and polarograms were again recorded.

Electrospray ionization mass spectrometry experiments. In ESI-MS experiments, direct injection of 50 μL of a sample, in 5×10^{-3} mol L^{-1} ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer at pH 7.5, was carried out at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} with a source temperature of 200 °C and desolvation temperature of 250 °C. The applied voltage was fixed at 4 KV, and the cone potential was maintained at 250 V. The mass spectra were collected throughout m/z ranging from 100 to 2500. The instrument control and mass spectra deconvolution was performed by means of Mass Hunter Workstation (B.02.00). A 1 : 9 acetonitrile (HPLC grade) -5×10^{-3} mol L^{-1} ammonium acetate mixture was adjusted at pH 7.5 and used as a mobile phase.

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

3. Data treatment

Polarograms were smoothed, baseline corrected and converted into data matrices using home-made programs implemented in MATLAB.[40] MCR-ALS analysis of data was carried out through several programs also implemented in MATLAB (some of them available at http://www.ub.edu/mcr/ndownload.htm), following the general methodology described in previous papers.[33–38] In this work, the constraints used were non-negativity and signal-shape.

Briefly, in the MCR-ALS analysis the matrices of currents **I** (nR, nE) are composed from the set of experimental voltammograms, which contain as many nR rows as the number of voltammograms recorded at each metal-to-ligand ratio and as many nE columns as potentials scanned in every run. After the smoothing and background correction, the matrix **I** is mathematically decomposed into the product of two factor matrices

$$I = CV^T + X \quad (1)$$

where matrix **C** (nR, N) is the concentration matrix describing the evolution of the **N** electrochemical components during the experiment, matrix $\mathbf{V^T}$ (N, nE) is the voltammetric matrix describing the pure individual voltammetric responses of these components, and matrix **X** (nR, nE) is the error or residual data matrix giving the data variation not explained by the proposed **N** contributions. Eqn (1) is solved iteratively using an alternating least squares (ALS) procedure. This equation assumes that data matrix **I** is bilinear, *i.e.*, that the electrochemical signal can be decomposed into the sum of individual contributions, each described by a concentration profile in matrix **C** and by a pure normalized voltammogram in matrix $\mathbf{V^T}$; that is, data follow a linear additive model like that proposed by Beer's law for absorption spectroscopy. In the electrochemical measurements, which have more complex natures than the spectroscopic ones, this assumption is less clear. However, based on previous experience,[27] it was assumed that in most situations the measured signal (current) is linearly dependent on the concentration of the electroactive species. Only signals with significant movements along the potential axis (as a consequence of fast equilibrium or kinetic effects) can introduce an excessive amount of non-linearity and hinder an accurate MCR-ALS analysis. Then, non-linearity can be corrected in some case using *shiftfit* algorithm,[32,41] which optimizes by least squares the potential shifts to be applied to the signals so that they remain at a given reference value.

At this point it is crucial to indicate the meaning of the concept of component (related to MCR-ALS) in the present context. For spectroscopic data, a component is associated to pure chemical species in solution, but for electrochemical data a component must be defined as a single electrochemical process giving a signal,[27] including not only redox processes but also other possible phenomena, such as electrode adsorption of species or capacitive currents due to the charging of the electrical double layer at the electrode surface. In any case, most situations, a single electrochemical process is produced by a single species, but in some others a single species can produce two or more simple electrochemical processes, in which case an accurate analysis must be done to correlate components (or processes) with chemical species.

4. Results and discussion

4.1 Cd/Cys-Gly/PC_2 system

The competitive complexation process of Cys-Gly and PC_2 towards Cd^{2+} was studied by means of DPP titrations of different combinations of the three species. Fig. 2a–c show the evolution

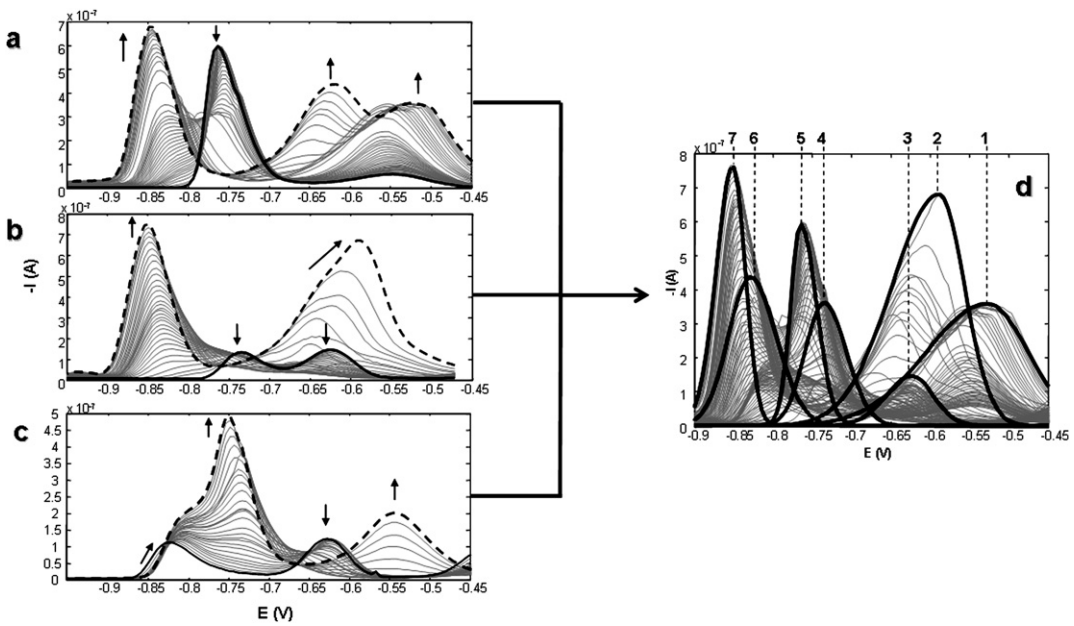


Fig. 2 Evolution of DPP curves along PC_2 or Cys-Gly additions to Cd/Cys-Gly or Cd/PC_2 solutions respectively, in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer (pH 7.5): a) PC_2 is added to a 1 : 2 Cd : Cys-Gly solution; b) PC_2 is added to a 2 : 1 Cd : Cys-Gly solution; c) Cys-Gly is added to a 3 : 1 Cd : PC_2 solution. Arrows indicate the tendency of the signal (— initial DPP curve; **---** final DPP curve). Unitary concentration: 1×10^{-5} mol L^{-1}. d) Initial estimation of components. Numbers in figure indicate the components involved in the reduction process: Cys-Gly (1), PC_2 (2), Cd^{2+} (3), Cd/Cys-Gly complexes (4 and 5) and Cd/PC_2 complexes (6 and 7).

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

of the DPP curves when one of the ligands is added to solutions containing partially free and/or bound (to the other ligand) Cd^{2+}. From these plots different groups of signals can be distinguished: (i) signals at more negative potentials than −0.65 V that are due to the reduction of the different complexes formed; (ii) signals at more positive potentials than −0.65 V related to the anodic oxidation of Hg in the presence of ligands and; (iii) a well defined peak at −0.63 V that corresponds to the free Cd^{2+} reduction.

When PC_2 is added to 1 : 2 Cd^{2+} : Cys-Gly solution, *i.e.* all metal ions initially complexed by the ligand (Fig. 2a), a decrease of the Cd/Cys-Gly signals ($E_p = -0.76$ V) combined with the appearance of a shoulder at more negative potentials than −0.80 V is observed. With further additions of PC_2, this shoulder develops into a very well defined signal ($E_p = -0.85$ V) at the end of the titration. Simultaneously an increase of the anodic oxidation of Hg signal at less negative potentials takes place (*ca.* −0.55 V). This behaviour seems to underline the fact that PC_2 displaces Cd^{2+} from the Cd/Cys-Gly complexes generating new and more stable Cd/PC_2 complexes.

When PC_2 is added to a 2 : 1 Cd^{2+} : Cys-Gly solution (Fig. 2b), free Cd^{2+} and Cd/Cys-Gly complexes are initially present giving two overlapping peaks. Successive additions of PC_2 produce a decrease of these signals in different proportions and an increase of the peak corresponding to Cd/PC_2 complexes (at −0.85 V) together with the characteristic wide signals of the ligands (at $-0.65 < E < -0.5$ V). In this case, a remarkable movement in the ligand peak (PC_2) is observed, which could cause additional difficulties in the chemometrical treatment.

An analogous situation, in which Cys-Gly is added to a 3 : 1 Cd : PC_2 mixture (Fig. 2c) was also studied; such a situation is characterized by the presence of two signals at the beginning of the titration: one is related with Cd/PC_2 complexes (Ep = −0.83 V), another with the free Cd^{2+} reduction (Ep = −0.63 V). Additions of Cys-Gly produce the depletion of the free Cd^{2+} and the formation of the successive complexes with Cys-Gly, which coexist with the Cd-PC_2 previously present in solution. At the end of the titration, an intense and asymmetric signal related to the presence of the new Cd/Cys-Gly complex and the previously existing Cd/PC_2 complex is observed. Simultaneously, the characteristic signals related with the anodic oxidation of Hg in the presence of free Cys-Gly ($E_p = -0.55$ V) is observed. In this experiment, the characteristic signal of free PC_2 is absent, which is an indicator that the Cd/PC_2 complex remains throughout Cys-Gly titration.

In addition, Cys-Gly is added to a 1 : 2 Cd^{2+} : PC_2 solution. Initially, all Cd^{2+} ions are chelated by PC_2, which yields a well defined signal at $E_p = -0.84$ V; this signal does not change with the successive additions of Cys-Gly, as would be expected, due to the greater stability of Cd-PC_2 complexes (results not shown). The increase of the signal at a less negative potential (*ca.* −0.55 V) is the only change observed in these voltammograms. This signal is related to the anodic oxidation of Hg in the presence of free Cys-Gly.

In order to analyze this behaviour (Fig. 2a–c) by MCR-ALS, voltammetric data were organized in a combined column-wise matrix, *i.e.*, sharing the same unit voltammograms but different concentration profile matrices. An initial estimation of components is necessary for the iterative ALS optimization. This estimation has been built with the *peakmaker* subroutine, considering the facts described above and the information from previous papers on the complexation processes of Cd/Cys-Gly[34] and Cd/PC_2.[35] Seven components are necessary for the proper resolution of data as Fig. 2d shows (components have been ordered considering their position on the potential axis). Some, or all, of them are present in the different titration experiments. At this point, it is important to reiterate that in voltammetric measurements, components are related to electrodic processes that do not necessarily correspond to chemical species as in the case of spectroscopic measurements.[27]

The number of components of each individual Cd/L (L = Cys-Gly or PC_2) matrix should be enough to explain the evolution of signals in the extended column-wise matrix. Therefore, components 1 and 2 correspond to the signal of free ligands, Cys-Gly ($E_p = -0.52$ V) and PC_2 ($E_p = -0.60$ V) respectively, component 3 to the reduction of free Cd^{2+} ($E_p = -0.63$ V), while the reduction of Cd^{2+} bound to Cys-Gly is shown by the presence of components 4 ($E_p = -0.74$ V) and 5 ($E_p = -0.76$ V). From previous studies[34] these components could be associated with ML and ML_2 complexes respectively. Reduction of Cd^{2+} bound to PC_2 yields components 6 and 7, at −0.83 and −0.86 V respectively.

Constraints of non-negativity (for both concentrations and signals), signal shape (for the voltammograms of all species) and selectivity (depending on the submatrix) have been applied to the MCR-ALS iterative process that yields unitary signals that are almost identical to and centred at the same potential as those used as initial estimation (Fig. 2d) and the concentration profiles shown in Fig. 3a–c, with a lack of fit (lof) of 15.04%. It is important to note the great power of the MCR-ALS in the resolution of combined matrices, that, considering such a high number of components, yields acceptable lof values.

Concentration profiles (Fig. 3a) of the sub-matrix in Fig. 2a show that components 4 and 5 (Cd/Cys-Gly complexes) suffer a progressive decrease from the first addition of PC_2. Parallel to this, component 6 rises and reaches a maximum at titrating ligand-to-Cd^{2+} ratios quite higher than what would be the expected ratio in a titration in the absence of Cys-Gly. This higher ratio could be due to the fact that the exchange equilibrium between ligands is not totally displaced, which is evidenced by the smooth decrease of components 4 and 5. Total displacement requires an additional PC_2 excess to reach the same 1 : 1 stoichiometry for the individual Cd^{2+}-PC_2 system. This behaviour suggests a rapid transfer of Cd^{2+} ions between peptides and, seemingly, the absence of mixed complexes. From ratios higher than 1 to the end of the titration, component 7 increases. This is due to the formation of a more stable complex with a signal similar to that of the 1 : 2 Cd/PC_2 complex observed in the absence of Cys-Gly. Component 1 increases throughout the titration which is consistent with the idea of PC_2 capturing the Cd^{2+} ions complexed with Cys-Gly. MCR-ALS results fails to explain free PC_2 evolution (component 2) due to the ambiguity with the signal of Cys-Gly.

For the sub-matrix in Fig. 2b, the best MCR-ALS results were obtained by assuming the absence of component 5 (ML_2, L = Cys-Gly). The concentration profile (Fig. 3b) supports the idea that PC_2 binds first to the free Cd^{2+} (component 3), subsequently displaces and binds Cd^{2+} from Cd/Cys-Gly complex (component 4), yields Cd/PC_2 complexes (components 6 and 7) at more

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

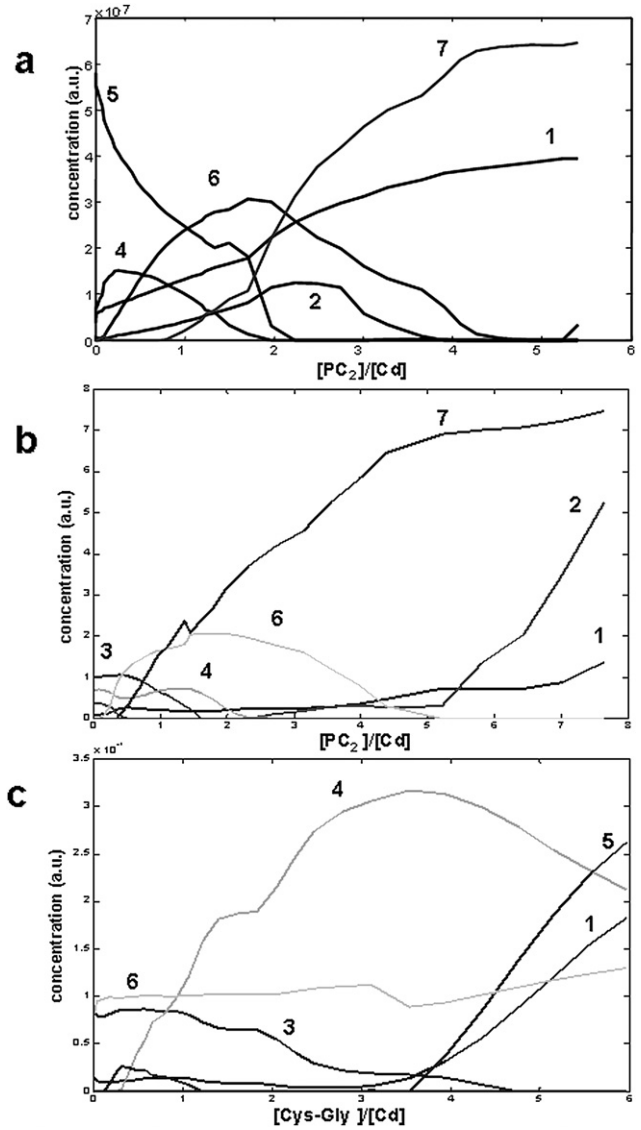


Fig. 3 Respective concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of the combined column-wise matrix of data shown in Fig. 2a–c. Applied constrains were non negativity and signal shape. The concentration profiles are plotted as function of the added ligand-to-ligand (a) or ligand-to-metal concentration ratios (b and c). Components are: Cys-Gly (1), PC_2 (2), Cd^{2+} (3), Cd/Cys-Gly complexes (4 and 5) and Cd/PC_2 complexes (6 and 7).

negative potentials and finally remains in excess as component 2. Component 6 achieves a maximum at a PC_2-to-Cd ratio very similar to that of the previous experiment, and component 7 starts to increase at ratios lower than in the previous case, probably favoured by the initial presence of free Cd^{2+}.

Concentration profiles obtained from the MCR-ALS analysis of the submatrix in Fig. 2c (Fig. 3c), by assuming the absence of components 2 and 7, give evidence that Cys-Gly binds only the free Cd^{2+} ions (component 3), giving successively the ML and ML_2 complexes (components 4 and 5 respectively), at less negative potentials than the initially present Cd-PC_2 complex (component 6). The concentration profile of this component does not change throughout the titration although it is somewhat affected by baseline problems. Once again, the added Cys-Gly does not have the capability of capturing the Cd^{2+} ions chelated by PC_2. Component 6 is stable throughout the titration.

To complete the competition study of Cys-Gly and PC_2 towards Cd complexation, successive aliquots of Cd^{2+} solution are added to an equimolar mixture of Cys-Gly and PC_2 (Fig. 4a). This type of titration (a ligand mixture with a metal ion that is initially absent in solution) is of great interest because it allows us a better prediction of the behaviour of a natural system when it is exposed to metal ion stress or contamination. Comparison between each individual ligand titration with Cd^{2+} (Fig. 4b) shows that signal evolution is very similar, reinforcing the concept of a greater stability of Cd/PC_2, complexes in comparison with those of Cd and Cys-Gly, and the absence of mixed ligand metal complexes.

Prior to the addition of Cd^{2+}, two signals related with the anodic oxidation of Hg in the presence of Cys-Gly (component 1,

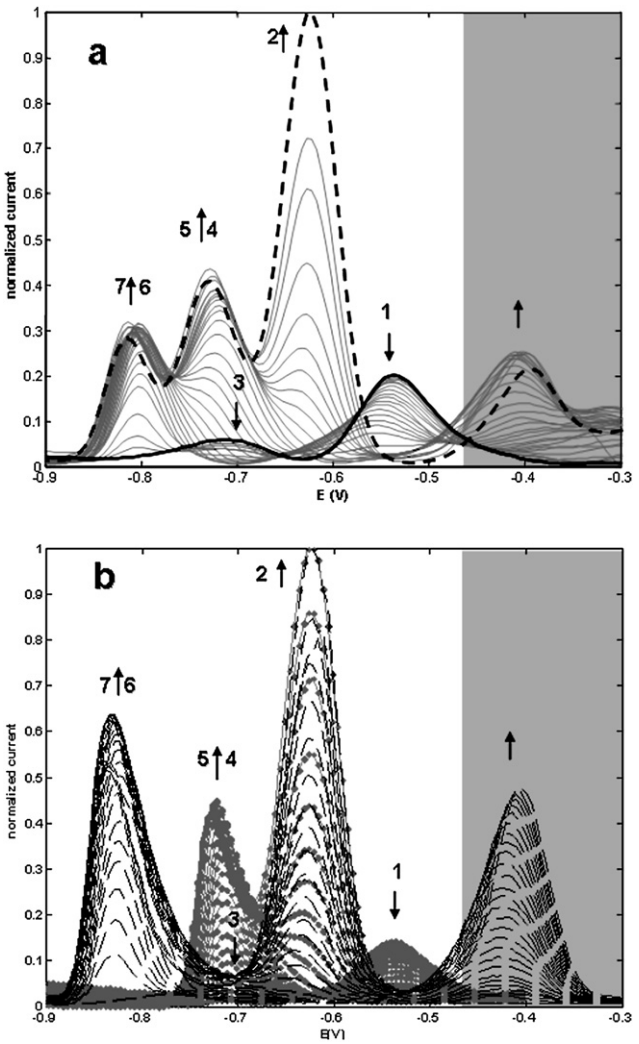


Fig. 4 Evolution of DPP curves along Cd^{2+} additions to a 1 : 1 Cys-Gly : PC_2 solution (a) (— initial DPP curve; **---** final DPP curve). Evolution of DPP curves along Cd^{2+} additions of independent titrations (b) of 1×10^{-5} mol L^{-1} Cys-Gly (**-·-**) or 1×10^{-5} mol L^{-1} PC_2 (**---**). All experiments at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer in the presence of KNO_3 0.1 mol L^{-1}. Arrows indicate the evolution of the signals.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

E_p = −0.50 V) and PC_2 (component 3, E_p = −0.70 V) are observed (continuous bold line in Fig. 4a). Successive additions of Cd^{2+} to the 1 : 1 Cys-Gly : PC_2 mixture clearly produce three wide signals: i) one that corresponds to the Cd^{2+} reduction peak (component 2, E_p = −0.63 V); ii) one to the formation of Cd/Cys-Gly complexes (components 4 and 5, at *ca.* −0.70V); and iii) the last one, at potentials around −0.8 V, that corresponds to PC_2 complexes (components 6 and 7). Close to −0.40 V, a signal that can be assigned to the anodic process of Hg in the presence of Cd/PC_2 complexes is observable (see Fig. 4b, dashed lines). This signal is excluded from MCR-ALS treatment, because non-relevant information can be obtained from it.

Following the same criteria, and taking into account the initial estimation of components used to explain individual titrations, MCR-ALS produced a reliable resolution of the data matrix in Fig. 4a (lof = 9,84%) when the constraints of non-negativity, for both concentrations and signals, and signal shape, for voltammograms of all components, are applied. Additionally, selectivity was applied to component 3, forcing it to a zero value once it reached null value. Unitary voltammograms and concentration profiles are represented in Fig. 5. In a first analysis, it is observable that the represented profile does not differ essentially from the concentration profiles of a PC_2 titration with Cd^{2+}[35]. Concentration profiles (Fig. 5b) show that PC_2 (component 3) reaches a minimum faster than Cys-Gly (component 1). However this last component does not reach a null value, probably due to the overlapping of these signals with those related to the anodic oxidation of Hg in the presence of Cd/PC_2 complexes.

These results also show that the presence of Cys-Gly does not affect the formation of Cd/PC_2 complexes. Only when component 6 (ML_2, L = PC_2) reaches its maximum (at ratio around 0.5) do components 4 and 5 (related to ML_2 and M_2L_2, L = Cys-Gly) start to appear. Furthermore, only when component 7 reaches a plateau (M_2L_2, L = PC_2) for ratios greater than 1.5, is a consistent increase in the signal of component 5 (M_2L_2, L = Cys-Gly) observable. This result expresses the greater capacity of PC_2 to bind Cd^{2+}, in comparison with a smaller ligand with a single thiol group.

Electrochemical results were compared with those obtained by ESI-MS for a 3 : 1 : 1 Cd/Cys-Gly/PC_2 ratio (at 5×10^{-5} mol L^{-1}) in ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer at pH 7.5 (Fig. 6). The ESI-MS spectrum (Fig. 6) shows an intense peak for $(PC_2 + H)^+$ at 540.15 *m/z*. A small peak at 179.05 *m/z* can be appreciated for $(Cys\text{-}Gly + H)^+$, as well as the Cd pattern at 113.91 *m/z*. Moreover, other peaks related to the different complexes can be distinguished. Thus, peaks at 468.97 *m/z* for $[Cd(Cys\text{-}Gly)_2\text{-}H]^+$, at 652.04 *m/z* for $[(CdPC_2)\text{-}H]^+$ and at 1301.07 *m/z* for $[Cd_2(PC_2)_2\text{-}5H]^+$ are clearly identified. The obtained pattern of each of these complexes matches the isotope abundance of Cd. Thus, the presence of the main species detected by voltammetry is confirmed by MS experiments.

However, ESI-MS results also revealed the possible existence of $[(Cd_2(PC_2)_2)\text{-}3H]^+$ at 761.93 *m/z* and $[(Cd_3(PC_2)_2)\text{-}5H]^+$ at 1410.96 *m/z*, and also the presence of a mixed ligand Cd complex in the form of $[(Cd_2(Cys\text{-}Gly)(PC_2)\text{-}5H]^+$ at 939.97 *m/z*, with a clear Cd pattern in all cases. This suggests that the existence of Cd_2PC_2, $Cd_3(PC_2)_2$ and $Cd_2(Cys\text{-}Gly)(PC_2)$ can occur, at least to some extent.

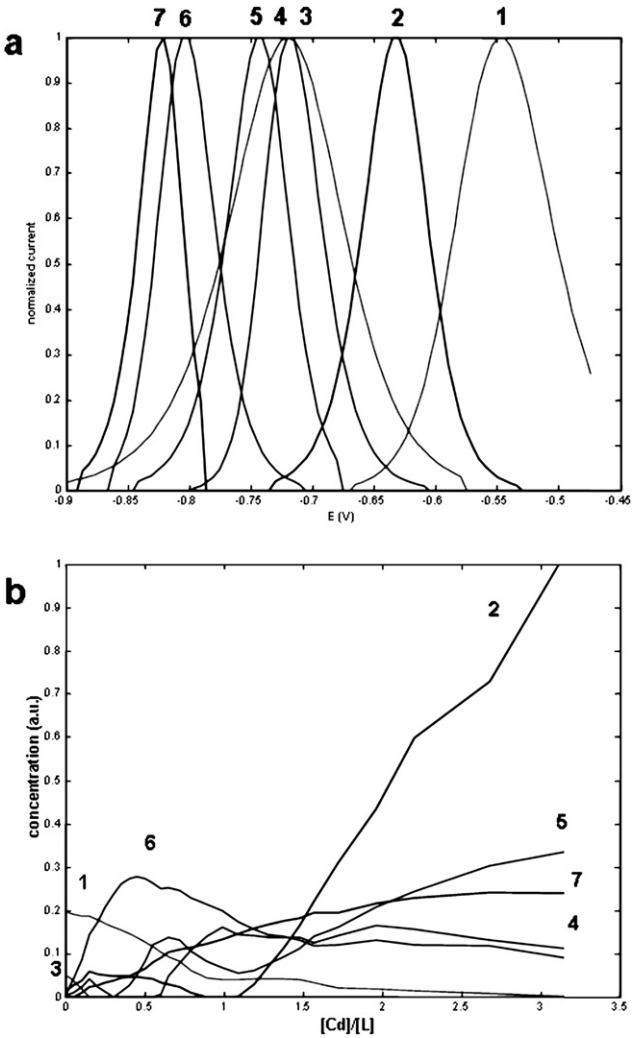


Fig. 5 Unitary voltammograms (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS decomposition of the data matrix shown in Fig. 4a. Applied constrains were non negativity, signal shape and selectivity for ligands at the beginning of the titration. The concentration profiles are plotted as function of the added Cd^{2+}-to-ligand concentration ratios (L = Cys-Gly or PC_2). Components are: Cys-Gly (1), Cd^{2+} (2), PC_2 (3), Cd/Cys-Gly complexes (4 and 5) and Cd/PC_2 complexes (6 and 7).

From a qualitative point of view the presence of these complexes is compatible with the voltammetric results described above, because components in voltammetry are related with electrodic processes that do not necessarily correspond to chemical species. Thus, the $Cd_3(PC_2)_2$ complex should maintain the signal of Cd bound to two PC_2 units through the thiol group and give a new signal related to the reduction of the third Cd bound to the carboxylate groups, which should appear at less negative potentials than the other, and that would be masked by the signal of Cys-Gly or Cd^{2+} in excess. A similar phenomenon could happen with the mixed complex that may co-exist as a transition step in the formation of more stable complexes with PC_2. Another possible explanation would be the presence of very low concentrations of three species in solution (so that they would not be detected by voltammetry) but with a high sensitivity in ESI-MS (thus yielding noticeable signals).

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

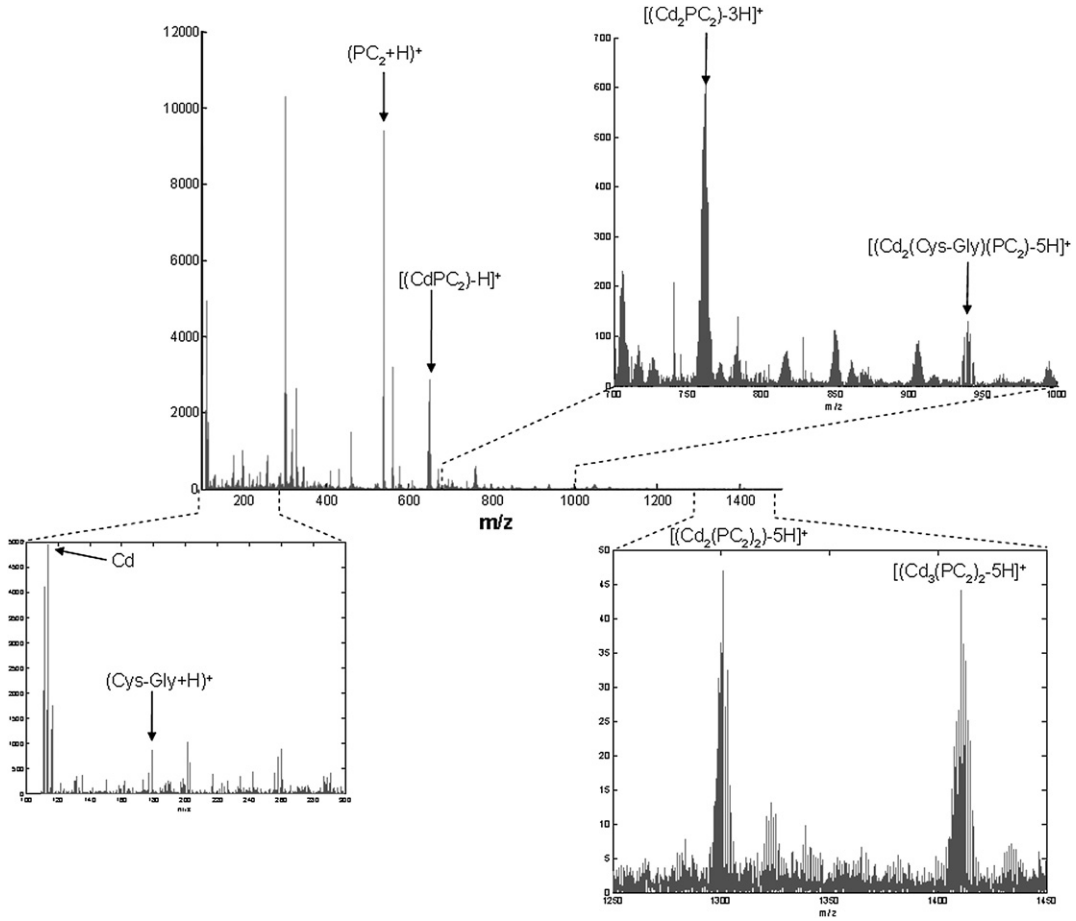


Fig. 6 Positive ESI-MS spectrum for a 3 : 1 : 1 Cd/Cys-Gly/PC_2 ratio (at 5×10^{-5} mol L^{-1}) solution in 5×10^{-3} mol L^{-1} ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer at pH 7.5.

4.2 Cd/Cys/PC_3 system

For the study of the Cd/Cys/PC_3 system, PC_3 is added to Cd:Cys solutions at different concentration ratios: i) Cd^{2+} ions are initially complexed (partially or totally) with the smaller ligand (Fig. 7a and b); and ii) Cys is added to a solution where Cd^{2+} is present in either free form or complexed with PC_3 (Fig. 7c). These examples are similar to those described in the previous system (Fig. 2a–c), and similar evolutions are observed.

When PC_3 is added to a 1 : 2 Cd^{2+} : Cys solution (Fig. 7a), a drastic decrease in the Cd/Cys signal (at $E_p = -0.69$ V) simultaneously to the appearance, at more negative potentials, of the typical Cd/PC_3 signal (at $E_p = -0.88$ V, Fig. 7a) is observed. Likewise, an increase of the anodic oxidation of Hg in the presence of free Cys takes place (at *ca.* −0.46 V). Throughout the titration, a remarkable movement in this signal is observed, mainly due to overlapping with the signal of the anodic oxidation of Hg in the presence of Cd/PC_3 complex. At the end of the titration, the peak due to the excess of PC_3 is observable at −0.66 V. As in the previous system, the ligand with more thiol groups (PC_3) displaces Cd^{2+} of its complexes with the smaller chain ligand (Cys), giving new and more stable complexes.

When PC_3 is added to a 2 : 1 Cd^{2+} : Cys solution (Fig. 7b), free Cd^{2+} and Cd/Cys complexes are initially present, giving two overlapping peaks. As in the previous system, the successive additions of PC_3 cause a decrease of both signals and an increase of the peak corresponding to Cd/PC_3 complexes (at −0.88 V) together with the signals of the ligands.

Successive additions of Cys to a 1 : 3 Cd : PC_3 solution (Fig. 7c) produces the depletion of the free Cd^{2+} and the formation of the successive Cys complexes (at −0.68 V), that coexist with the Cd/PC_3 complex ($E_p = -0.84$ V). At the end of the titration, an intense and asymmetric peak related to the presence of both the new Cd/Cys complex and the previously existing Cd/PC_3 complex is observed. Parallel to this, the characteristic signal related to the anodic oxidation of Hg in the presence of free Cys ($E_p = -0.49$ V) is observed, and the absence of the characteristic signal of free PC_3 is remarkable.

The proper MCR-ALS resolution of data in Fig. 7a–c is obtained considering the six components shown in Fig. 7d as an initial estimate for ALS iterative optimization. Ligands in excess are assigned to components 1 and 3, Cys and PC_3 respectively. Component 2 correlates to the reduction of free Cd^{2+} ions at −0.62 V. The reduction of Cd^{2+} bound to Cys is shown by the presence of component 4 and 5 (ML and ML_2 respectively are expected in these type of titrations[39]). In the case of the Cd/PC_3 complex only one component (6) was considered due to constant peak potential throughout the additions.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

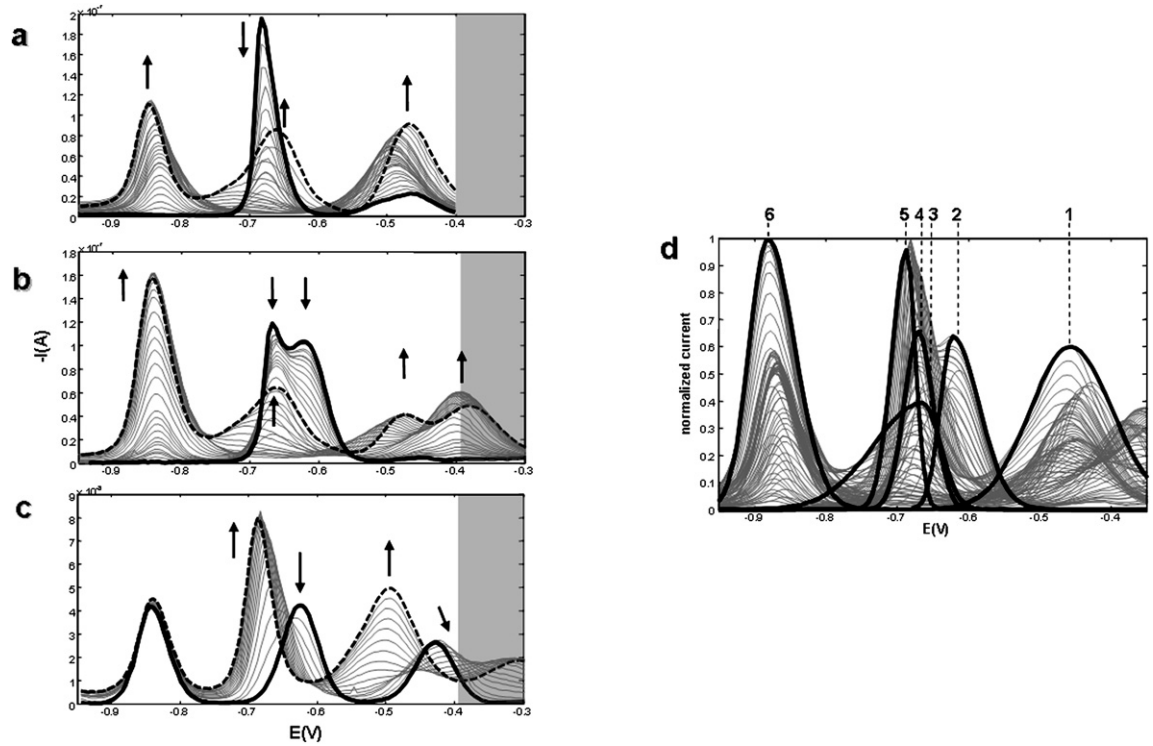


Fig. 7 Evolution of DPP curves along PC_3 or Cys additions to Cd/Cys or Cd/PC_3 solutions respectively, in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer (pH 7.5): a) PC_3 is added to a 1 : 2 Cd : Cys solution; b) PC_3 is added to a 2 : 1 Cd : Cys solution; c) Cys is added to a 3 : 1 Cd : PC_3 solution. Arrows indicate the signals tendency (— initial DPP curve; **---** final DPP curve). d) Initial estimation of components for the MCR-ALS analysis. Numbers in figure indicate the components involved in the reduction process: Cys (1), Cd^{2+} (2), PC_3 (3), Cd/Cys complexes (4 and 5) and Cd/PC_3 complexes (6). Unitary concentration: 1×10^{-5} mol L^{-1}.

The constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal shape (for the voltammograms of all species) were applied. The MCR-ALS iterative process (preceded by the application of the *shiftfit* algorithm[32] to components 1 and 3, signal correlated with each ligand in excess) yielded the unitary voltammograms as those assumed in Fig. 7d and the concentration profiles shown in Fig. 8a–c, with overall lacks of fit of 12.06, 12.96 and 8.92% respectively. Briefly, concentration profiles show that the successive addition of PC_3 causes a decrease of the component assigned to Cd^{2+}/Cys complexes (4/5) and free Cd^{2+}(2), although, when present, the last clearly decreases more sharply (Fig. 8b). When data is plotted in front of added ligand-to-Cd ratios it is clear that the predominance of the Cd/PC_3 complex (component 6) occurs at quite similar values. As expected, the addition of Cys to the solution where Cd^{2+} is partially complexed with PC_3 (Fig. 8c) does not affect the concentration profile of Cd/PC_3 complex (component 6), sequestering only the remaining free Cd^{2+} in solution and yielding components 4 and 5 (ML and ML_2 respectively).

Positive ESI-MS data confirm the presence of Cd/PC_3 complexes, ML (in majority) and M_2L (poorly detected). Therefore, these results lead us to believe that component 6 is related to an ML (Cd/PC_3) complex. No coherent Cd pattern of Cd/Cys complexes was detected, nor was a mixed ligand Cd^{2+} complex found (data not shown). Although Cd/Cys species were not detected in ESI-MS, their formation in solution is indisputable based on voltammetric data. The formation of a mixed ligand complex is plausible, although it must occur in very specific conditions and at low concentration levels. This system would be a favourable scenario for the occurrence of mixed ligand-metal complexes. Cys is the smallest PC_n fragment containing a thiol group that yields stable complexes with Cd^{2+}. Moreover, PC_3 seems to have the adequate chain length to avoid bulk effects and, more importantly, it has three thiol groups. Considering that Cd^{2+} coordinates in a tetrahedral way, it would be probable that the Cd^{2+} would be bound to one PC_3, through its three thiol groups, allowing for the possibility of Cd^{2+} coordination with a fourth thiol from Cys.

5. Conclusions

The work described herein shows the usefulness of voltammetry assisted by MCR-ALS for resolving complex mixtures of heavy metal ions and phytochelatin-related peptides. For this purpose, the comparison and, in some cases, the combination of datasets obtained separately for the different ligands appears to be crucial.

For the particular systems here considered, the results are evidence that longer chain peptides containing more thiol groups easily displace shorter peptides from their metal complexes. Such displacements seem to occur quickly, since equilibrium is reached within the few minutes taken by every addition followed by solution stirring. Despite the fact that the systems were deliberately chosen to favour the formation of mixed ligand complexes to easily fulfil cadmium tetrahedral coordination, no voltammetric evidence of such species was found.

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

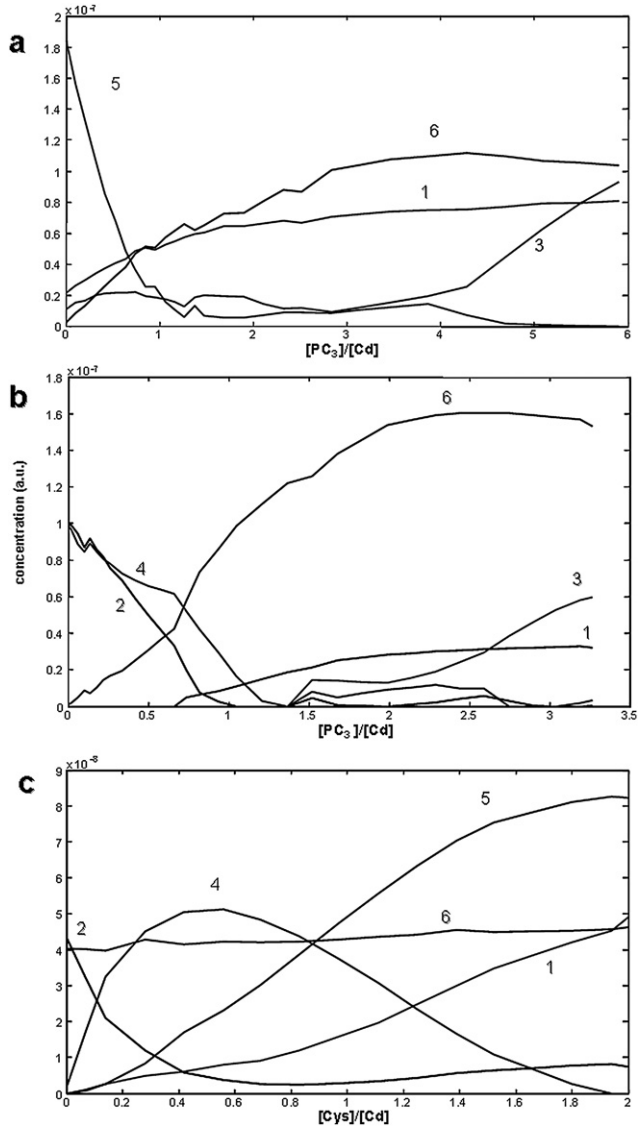


Fig. 8 Respective concentration profiles obtained in the MCR-ALS decomposition of the data matrices shown in Fig. 7a–c. Applied constrains were non negativity and signal shape. The concentration profiles are plotted as function of the added ligand-to-total Cd^{2+} concentration ratios. Components are: Cys (1), Cd^{2+} (2), PC_3 (3), Cd/Cys complexes (4 and 5) and Cd/PC_3 complex (6).

The complementary ESI-MS information confirms the presence in both systems of the majority species detected voltammetrically. In the case of the Cd^{2+}-PC_2-Cys-Gly mixture, ESI-MS detects also a few mixed ligand species. This could mean that: i) such species exist in solution in very low concentrations that are not detectable by voltammetry, ii) they are detected by voltammetry, but their signals are so close to these of majority species that they cannot be distinguished from them, or iii) they do not exist in solution, but are created during the ionisation process of ESI-MS.

As hypothesis i) appears to be the most probable one, the question is why mixed ligand complexes are not stabilised as an intermediate stage between the substitution of several short chain ligands by the first and the second longer chain ligand. This could be related to steric effects or to the tendency of some thiol peptides to join two long chain molecules with the binding of several metal ions. In either case, further experiments with complementary techniques would be required to resolve this question.

Finally, further voltammetric studies towards the competitive metal binding of different chain-length phytochelatins would be of great interest, along with examining how the chain-length influences the complexation process. This information could be very useful to genetically modify the plants to improve their phytoremediation efficiency.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (projects CTQ2006-14385-C02-01 and CTQ2009-09471). Rui Gusmão also thanks the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for his Ph.D. grant (BES-2007-15385). The authors are also grateful for the aid received from E. Chekmeneva. Last but not least, helpful discussions about the ESI-MS experiments with Laura Ortiz and Irene Vidal are also acknowledged.

References

1 G. Bertin and D. Averbeck, *Biochimie*, 2006, **88**, 1549.
2 S. Chatterjee, S. Kundu, S. Sengupta and A. Bhattacharyya, *Mutat. Res., Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 2009, **663**, 22.
3 C. Cobbett and P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2002, **53**, 159.
4 E. Grill, E. -L. Winnacker and H. H. Zenk, *Science*, 1985, **230**, 674.
5 M. H. Zenk, *Gene*, 1996, **179**, 21.
6 D. E. Salt and W. E. Rauser, *Plant Physiol.*, 1995, **107**, 1293.
7 E. Pilon-Smits, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 2005, **56**, 15.
8 I. Raskin and B. D. Ensley, *Phytoremediation of ToxicMetals: Using Plants to Clean Up the Environment*, Wiley, New York, 2000.
9 S. Cherian and M. M. Oliveira, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 9377.
10 S. L. Doty, *New Phytol.*, 2008, **179**, 318.
11 K. Hirata, N. Tsuji and K. Miyamoto, *J. Biosci. Bioeng.*, 2005, **100**, 593.
12 J. Szpunar, *Analyst*, 2000, **125**, 963.
13 E. Bramanti, D. Toncelli, E. Morelli, L. Lampugnani, R. Zamboni, K. E. Miller, J. Zemetra and A. D'Ulivo, *J. Chromatogr., A*, 2006, **1133**, 195.
14 H. Chassaigne, V. Vacchina and R. Lobinski, *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 300.
15 T.-Y. Yen, J. A. Villa and J. G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.*, 1999, **34**, 930.
16 A. P. Navaza, M. Montes-Bayo, D. L. LeDuc, N. Terry and A. Sanz-Medel, *J. Mass Spectrom.*, 2006, **41**, 323.
17 L. Chen, Y. Guo, L. Yanga and Q. Wang, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1403.
18 R. K. Mehra, V. R. Kodati and R. Abdullah, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1995, **215**, 730.
19 B. J. Fuhr and D. L. Rabenstein, *J. Am. Chem. Soc.*, 1973, **95**, 6944.
20 G. Scarano and E. Morelli, *Electroanalysis*, 1998, **10**, 39.
21 V. Supalkova, D. Huska, V. Diopan, P. Hanustiak, O. Zitka, K. Stejskal, J. Baloun, J. Pikula, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, M. Beklova and R. Kizek, *Sensors*, 2007, **7**, 932.
22 V. Dorĉák and I. Šestáková, *Bioelectrochemistry*, 2006, **68**, 14.
23 P. C. White, N. S. Lawrence, J. Davis and R. G. Compton, *Electroanalysis*, 2002, **14**, 89.
24 M. Heyrovský, P. Mader, S. Vavricka, V. Veselá and M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.*, 1997, **430**, 103.
25 M. Mladenov, V. Mircesk, I. Gjorgoski and B. Jordanosk, *Bioelectrochemistry*, 2004, **65**, 69.
26 M. Yamamoto, T. Charoenraks, H. Pan-Hou, A. Nakano, A. Apilux and M. Tabata, *Chemosphere*, 2007, **69**, 534.
27 M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and R. Tauler, *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 49.
28 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *Trends Anal.Chem.*, 2006, **25**, 86.

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2010

29 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 295.
30 Y. Ni and S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **626**, 30.
31 A. de Juan and R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 163.
32 A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 470.
33 J. M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2001, **126**, 371.
34 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban and R. Tauler, *Analyst*, 2002, **127**, 401.
35 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, I. Šestáková, J. Velek, C. Ariño and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 2002, **520**, 111.
36 B. H. Cruz, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 2005, **39**, 778.
37 E. Checkmeneva, R. Prohens, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.*, 2008, **42**, 2860.
38 A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Chim Acta*, 2007, **584**, 403.
39 R. Gusmão, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, **394**, 1137.
40 The MathWorks (2006) *MATLAB version 7.3.0.267*. The MathWorks, Natick.
41 A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 112.

Published on 13 November 2009 on http://pubs.rsc.org | doi:10.1039/B918293D
Downloaded on 23 March 2012

6.4 *Electrochemichal Survey of the Chain Length Influence on the Competitive Binding of Cadmium by Phytochelatins*

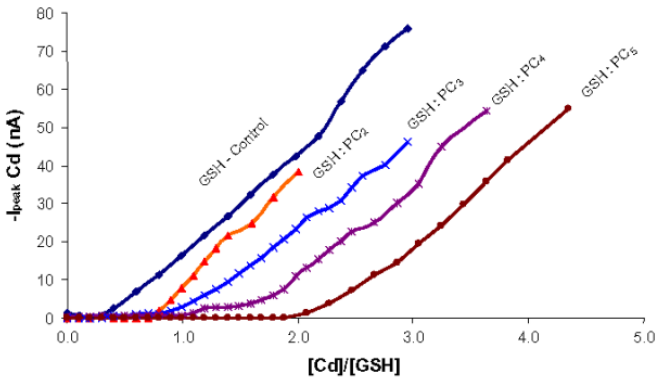
Teniendo en cuenta los resultados anteriores, el presente trabajo implicó una investigación más exhaustiva de la influencia de la longitud de la cadena de las PC_n en el enlace con el ión metálico y en la competición entre ligandos. La metodología DPP/MCR–ALS se aplicó al análisis del desplazamiento del Cd^{2+} complejado con GSH (que es de hecho la PC_1) por diferentes PC_n (n=2-5) de creciente longitud de cadena. Este fue el primero trabajo donde se estudiaron los procesos de complejación de la PC_5.

En un primer apartado se añadió PC_n (valoración directa) a un mezcla de Cd^{2+} y el complejo ML (Cd-GSH), con el objetivo de saber si la PC_n añadida compleja con igual facilidad con las dos formas del ion metálico en solución. Se hicieron igualmente valoraciones inversas (metal sobre ligandos) a la mezcla de GSH y PC_n, donde se estudió la capacidad complejante (CC) de las diferentes soluciones. Se buscó establecer una relación entre las CC de las PC_n y la estabilidad de los complejos formados (estimación a partir de los potenciales de reducción). En el último apartado se estudió la complejación competitiva de mezclas de PC_2/PC_3 en presencia de Cd^{2+}.

Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium

Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J.M.; Esteban, M.

Analytical Biochemistry, 406(1), 61 - 69 (2010)



Analytical Biochemistry 406 (2010) 61–69

Contents lists available at ScienceDirect

Analytical Biochemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/yabio

Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatins competitive binding by cadmium

Rui Gusmão, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban *

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, E-08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 3 May 2010
Received in revised form 18 June 2010
Accepted 22 June 2010
Available online 1 July 2010

Keywords:
Glutathione
Phytochelatin
Cadmium
Competitive binding
Multivariate curve resolution with alternating least squares
Differential pulse voltammetry

ABSTRACT

Multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR–ALS) was applied to voltammetric data obtained in the analysis of the competitive binding of glutathione (GSH) and phytochelatins [$(\gamma$Glu-Cys$)_n$-Gly, PC_n, $n = 2–5$] by Cd^{2+}. The displacements between ligands and chain length influence on the competitive binding of PC_n toward Cd^{2+} were investigated. The analysis of the resulting pure voltammograms and concentration profiles of the resolved components suggests that ligands containing more thiol groups are able to displace the shortest chain ligands from their metal complexes, whereas the opposite does not happen. However, when the length of the chain surpasses that of PC_3, the binding capacity of the molecule still increases (i.e., it can bind more metal ions), but the position and shape of the voltammetric signals practically rest unchanged. This suggests that at this level, the stability of metal binding could depend more on the nature of the binding sites separately than on the quantity of the sites (i.e., the chain length).

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Cadmium is an important toxic metal involved in mining activities, the metallurgic industry, and the manufacture of batteries, pigments, and plastic stabilizers. Consequently, its presence in the environment must be controlled. Some organisms develop defense mechanisms to expel or immobilize metal ions. In the case of plants, one of the most important mechanisms for toxic metal sequestration and tolerance is related to the chelation by phytochelatins (PC_n),[1] a class of Cys-rich peptides with the general formula $(\gamma$Glu-Cys$)_n$-Gly, where $n = 2–11$ [1,2]. It is important to create sinks for metals and metalloids, either by strong binding or by sequestration, in the above-ground tissues [3]. For these reasons, knowledge of PC_n complexation mechanisms with toxic metals becomes very important and the extended use of plants, and their associated microbes, in phytoremediation of metal-contaminated soils and waters evidences the importance of such complexation processes [4].

Numerous analytical approaches have been developed for the analysis and structural identification of the different metal–PC_n complexes (or fragments) [5–9]. Electrochemical techniques have proved to be powerful tools for detection of Cys-rich peptides in biological and nonbiological samples [10]. Furthermore, relevant information on physicochemical properties of metal complexes with PC_n [11] or metallothioneins (MTs) [12,13] was provided by electrochemical methods because they yield different signals for the free peptide, the free metal ion, and the bound metal in different chemical environments and also allow direct detection of thiols [10]. As a consequence of the great affinity of thiol compounds toward mercury, the use of mercury electrodes involves the formation of mercurous and mercuric thiolates, both of which are strongly adsorbed on the electrode [10]. Therefore, several anodic signals are usually obtained in the voltammetric study of metal–thiolate systems. This causes additional difficulties when they overlap with the characteristic signals of the considered species, although in some cases they allow us to follow the evolution of free thiolate groups. Discrimination among thiols and their metal complexes might become a difficult task, with minor shifts in potential effectively preventing voltammetric resolution of peaks.

A valuable improvement of electrochemical speciation methods is achieved when these are assisted by powerful chemometric tools such as multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR–ALS) [14–16]. The use of chemometrics in electroanalytical chemistry is not as popular as in spectroscopy [16], although recently the application of these methods for mathematical resolution of overlapping signals, calibration, and model identification has increased [14]. The implementation of new restrictions such as signal shift correction to prevent linearity

* Corresponding author. Fax: +34 93 402 12 33.
E-mail address: miquelestebanc@ub.edu (M. Esteban).

[1] *Abbreviations used:* PC, phytochelatin; MT, metallothionein; MCR–ALS, multivariate curve resolution with alternating least squares; GSH, glutathione; DPP, differential pulse polarography; ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry; ITC, isothermal titration calorimetry; CD, circular dichroism; Tris–HNO_3, [*tris*(hydroxymethyl)aminomethane]-nitric acid; SMDE, static mercury drop electrode; SVD, singular value decomposition; LOF, lack of fit.

0003-2697/$ - see front matter © 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.
doi:10.1016/j.ab.2010.06.034

losses [17], adapted to the special characteristics of electrochemical signals, has allowed the resolution of quite intricate metal complex systems.

A great deal of knowledge has been obtained by these means for systems involving the complexation process of a metal ion and a unique ligand [14], among them glutathione (GSH) [18], MT domains [19], and PC_n [20–24]. Although differential pulse polarography (DPP)/MCR–ALS might not always allow us to propose structures for the complexes, the stoichiometries deduced from the MCR–ALS concentration profiles provide essential information on the composition of complexes that can be complemented with nonelectrochemical techniques such as positive mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI–MS) and isothermal titration calorimetry (ITC) [22]. Another strategy to solve some uncertainties is the MCR–ALS analysis of an augmented data matrix containing experiments carried out under the same conditions by different analytical techniques such as DPP and circular dichroism (CD) [17].

MCR–ALS has also been applied to voltammetric data obtained in the study of competitive complexation of Zn^{2+} and Cd^{2+} by PC_3 [21] and PC_4 [22]. The addition of Cd^{2+} and Zn^{2+} to metal-free PC_n allows us to voltammetrically monitor metal complexation and metal exchange processes. Examination of the relationships that exist between various metal ions and the metal-induced PC_n is helpful because metal-polluted natural systems are typically contaminated by more than one metal. Likewise, it is also of great interest to study metals in the presence of ligand mixtures so as to investigate possible interactions and competitive binding processes.

In previous articles [23,24], the metal binding competition between two different GSH fragments (Cys and Cys-Gly) or a PC_n and a fragment, for metal binding, was investigated by means of the combination of DPP and MCR–ALS. For the particular systems considered, the results evidenced that longer chain peptides, containing more thiol groups, easily displace shorter peptides from their metal complexes and also that such displacement is very fast given that equilibrium is reached within the few minutes taken by every addition followed by solution stirring. Despite the fact that those systems were deliberately chosen to favor the formation of mixed ligand complexes to easily fulfill Cd^{2+} tetrahedral coordination, no voltammetric evidence of such species was found.

Taking into account such preliminary results, the current work involved a more exhaustive investigation into the role of the PC_n chain length in metal binding and in the competition between ligands. For this purpose, the combined DPP/MCR–ALS methodology was applied to the analysis of the displacement of GSH (which is in fact PC_1) from its metal complexes by different PC_n of increasing chain length.

Materials and methods

Chemicals and instrumentation

GSH, in the reduced form, was provided by Merck with purity greater than 99%. The PCs $(\gamma Glu\text{-}Cys)_n$-Gly ($n = 2–5$), as trifluoroacetates, were provided by DiverDrugs (Barcelona, Spain) with purity ranging from 96.9% to 99.0%. Stock solutions of thiol peptides (1×10^{-3} mol L^{-1}, 1 ml) were freshly prepared and manipulated under inert atmosphere to guarantee that thiols were present in the reduced form. To ensure a more accurate homogeneity, peptide solutions were mixed at 1400 rpm for 1 min using Eppendorf Mixmate. Ultrapure water (Milli-Q Plus 185 system, Millipore) was used in all experiments.

All other reagents were analytical reagent grade from Merck. Cd^{2+} stock solution was prepared from $Cd(NO_3)_2{\cdot}4H_2O$ and standardized complexometrically. [Tris(Hydroxymethyl)aminomethane]-nitric acid (Tris–HNO_3, 0.1 mol L^{-1}) was used as pH 7.5 buffer, and 0.1 mol L^{-1} KNO_3 was used as supporting electrolyte to set ionic strength. At the selected pH, the hydrolysis of Cd^{2+} is negligible [25] and buffer did not bind significantly with Cd^{2+} under the current conditions.

Polarographic measurements were performed in a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. Working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.9 mm^2, an Ag/AgCl/KCl (3 mol L^{-1}), and a glassy carbon, respectively, all of them from Metrohm. Double distilled Hg was used. Instrumental parameters for DPP experiments were as follows: drop time of 1 s, scan rate of 0.005 V s^{-1}, pulse time of 0.05 s, and pulse amplitude of 50 mV.

pH measurements were made with an Orion SA 720 pH meter. All of the experiments were carried out at 25 °C, and purified nitrogen (Linde N50) was used for solution deaeration.

Voltammetric titrations

In each case, 20 ml of a 10^{-5} mol L^{-1} (unitary concentration) starting solution was placed in the voltammetric cell at constant ionic strength (0.1 mol L^{-1}) and pH (7.5) to avoid pH and counter ion concentration influences in the complexation. After deaerating with pure N_2 for 20 min, the initial differential pulse polarogram was recorded. Furthermore, successive aliquot additions from a 10^{-3} mol L^{-1} Cd^{2+} or peptide solution were made, and polarograms were again recorded. After every addition, solutions were purged and mechanically stirred for 1 min.

To obtain the complexing capacity curves (see Results), 20 ml of equimolar mixtures of GSH and PC_n ($n = 2–5$) at 5×10^{-6} mol L^{-1} (each peptide) was placed in the voltammetric cell at similar ionic strength and pH as in the previous experiments. After deaerating with pure N_2 for 20 min, the initial differential pulse polarogram was recorded. After every successive addition of Cd^{2+} aliquots, solutions were purged and mechanically stirred for 1 min. Cd^{2+} aliquots were added until a clear signal corresponding to the reduction of added Cd^{2+} in excess was observable ($E = -0.62$ V).

Data treatment

Polarograms were smoothed, baseline corrected, and converted into data matrices using homemade programs implemented in MATLAB [26]. MCR–ALS analysis of data was carried out through several programs also implemented in MATLAB (some of them available at http://www.ub.edu/mcr/ndownload.htm) following the general methodology described in previous articles [17–22].

Finally, it is important to note that in electrochemical measurements the concept of "component" in MCR–ALS refers to an electrochemical process and not to a chemical species, as it is typically encountered in spectroscopic data. Although an algorithm such as singular value decomposition (SVD) [14] can provide information on the optimal number of components, it is crucial to take into account the previous electrochemical knowledge of these systems [19–22]. These considerations play a key role in further interpretation of MCR–ALS results.

Results and discussion

Additions of increasing chain length PC_n to a Cd^{2+}/GSH system

The chain length influence on the competitive binding of GSH and PC_n ($n = 2–5$) toward Cd^{2+} was studied by means of DPP titrations. Fig. 1A–D show the evolution of the DPP curves when different PC_n are added to initial 2:1 Cd^{2+}/GSH solutions. Common to all

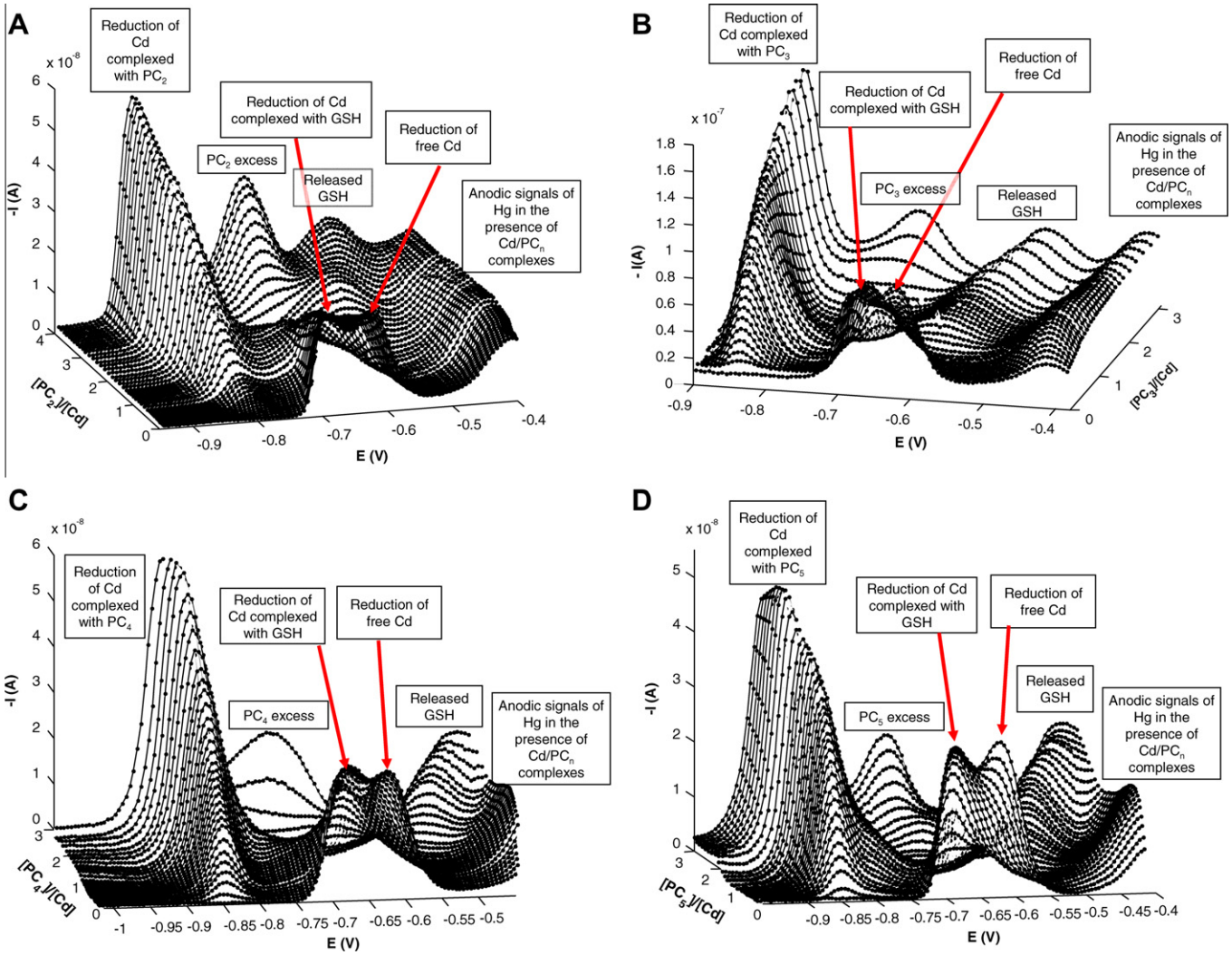


Fig. 1. Evolution of DPP curves (current vs. potential) along PC_n additions to 2:1 Cd/GSH solutions (10^{-5} mol L^{-1}) in 0.1 mol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer (pH 7.5): (A) PC_2; (B) PC_3; (C) PC_4; (D) PC_5. The third axis indicates the ratio between the added PC_n and Cd present in solution. The boxes summarize the process associated with every signal.

situations, free Cd^{2+} and Cd/GSH complex are initially present, giving two overlapping reduction peaks ($-0.69 < E < -0.62$ V). In all cases, the successive additions of PC_n produced a progressive decrease of these signals (at first that of the free Cd^{2+} ion and later that of Cd/GSH complex) simultaneously with the appearance and increase of the peak corresponding to Cd/PC_n complexes ($E < -0.80$ V). At the end of the titration, characteristic wide signals related to free GSH ($E < -0.55$ V) and PC_n in excess ($-0.80 < E < -0.65$ V) are also present. At more positive potentials, signals that can be assigned to the anodic process of Hg in the presence of Cd/PC_n complexes are observable (in Figs. 1, 3 and 5). These signals are excluded from MCR–ALS treatment because nonrelevant information can be obtained from them.

A comparison of these plots indicates that the most remarkable difference is observed in the case of PC_2 additions. The reduction peak related to Cd/PC_2 (Fig. 1A) appears at less negative potentials than those for the other PC_n (Fig. 1B–D). The difference observed reaches a maximum value of 33.5 mV when comparing Cd/PC_2 (Fig. 1A) with Cd/PC_5 (Fig. 1D). It is relevant to recall that, in general, the more negative the reduction peak potential value, the stronger the metal–ligand bond [14]. For PC_n with n from 3 to 5, the signals related to Cd/PC_n appear at similar potential values (~ -0.86 V) and the differences ($\sim$5 mV) seem to be negligible.

Significant differences observed in these plots (Fig. 1A–D) are the shapes and potentials of the peaks related to PC_n excess. Depending on the titration, their evolutions and final potentials are quite different. As PC_n chain length increases, the peak shape at the end of the titration changes from a symmetric peak for PC_2 (Fig. 1A) to an asymmetric double peak for PC_5 (Fig. 1D). Moreover, a maximum difference of 60 mV in the peak potential is observable.

Other signals greatly affected by these variations are those related to the reduction peak of free GSH (at ~ -0.50 V). One would expect that when GSH is released from its metal complex, the reduction peak would have the same potential value. Such is not the case given that there is a significant GSH peak movement within each titration, causing a difference of up to 95.9 mV (see Table S1 in Supplementary material). The main cause for GSH signal shift can be attributed to either the anodic Hg signals in the presence of Cd/PC_n complexes or the chain length difference among PC_n. Signal displacement yields a decrease in the linearity of the data, produces too large errors, or demands a high number of components in the data treatment.

To analyze these data (Fig. 1A–D) by MCR–ALS, an initial estimation of unitary voltammograms or concentrations profiles is necessary. To build the initial estimation [14], information from the individual titrations was used (i.e., the complexation process

of Cd with GSH [18] and PC_n [19–22] separately). The number of components in each case has been explained in previous articles and can be found in the literature [19–22] except for PC_5 (unpublished observations).

It can be considered that if no mixed ligand complex is formed, the number of components of each individual Cd/L matrix (where L = GSH or PC_n) should be enough to explain the evolution of signals. Therefore, six or seven components (depending on the added PC_n) are necessary for the proper resolution of data. To simplify the explanation, the components have been ordered by their sequential position on the potential axis.

Component 1 corresponds to the signal of free GSH at the end of the titration ($-0.54 < E_p < -0.44$ V), whereas the excess of each PC_n in the final segment of the titration was assigned to component 3 ($-0.72 < E_p < -0.69$ V). Components 2 and 4 due to the free Cd^{2+} reduction ($E_p = -0.62$ V) and the 1:1 Cd/GSH complex (ML, $E_p = -0.69$ V) [18], respectively, are common to all titrations prior to the additions of PC_n. The reduction of Cd^{2+} bound to PC_n is shown by the presence of components 5 (ML) and 6 (ML_2) exclusively in the case of PC_2. Table 1 summarizes the main characteristics of the electrochemical components and involved processes.

Constraints of non-negativity (for both concentrations and signals), signal shape (for the voltammograms of all species), and selectivity (depending on the submatrix) have been applied to the MCR–ALS iterative process. It yields the unitary signals that are almost identical to, and are centered at the same potential as, those used as the initial estimation and the concentration profiles shown in Fig. 2A–D, with a lack of fit (LOF) varying from 15% to 21%. Although this is a considerable LOF, the complexity of the systems, including peak movements for GSH and anodic signals that prevent an accurate MCR–ALS resolution, must be taken into account. Table S1 summarizes these results. From these numbers, it is remarkable that the signals of free and complexed PC_n suffer a much greater potential shift when chain length changes from 2 to 3 than when it increases from 3 to 5. Remarkably, the opposite happens for GSH, whose signals only start to move for n values higher than 3.

In Fig. 2A–D, concentration profiles are shown as a function of the ratio between the added PC_n and the total metal ion concentrations. These confirm that free Cd^{2+} ion (component 2) is easily displaced by PC_n from its GSH complex (component 4). In all titrations, the free Cd^{2+} concentration profile has a sharper decrease and reaches its minimum at progressively smaller ratios as the number of thiol groups in the PC_n increases. Likewise, the decrease of the Cd/GSH complex profile (component 4) reinforces the idea of GSH as an efficient donor of metals into PC_n. Also, a greater capacity to capture metal ions as a function of the number of thiol groups is registered, whether in the free or complexed form.

Free GSH (component 1) starts to increase more sharply when free Cd^{2+} is complexed with PC_n (component 5, ML) or since the very first additions of PC_n to solution. Furthermore, in some cases, GSH could not be distinguished from the Hg anodic process with metal complexes due to major potential shifts and overlapping (Fig. 1D). PC_n excess (component 3) is relevant only at the end of the titration. In agreement with previous observations, the presence of free PC_n takes place at lower peptide-to-metal ratios as the number of thiol units increase. In the specific case of titration with PC_2 (Fig. 1A), another component for Cd/PC_2 that corresponds to ML_2 complex was considered. For the remaining Cd/PC_n, only one component was assigned to the complex formation, based on SVD results and positive mode ESI-MS results of Cd/PC_3 [24] and Cd/PC_5 [27] showing that ML is the predominant complex at the similar concentration levels and pH.

Additions of Cd^{2+} to PC_n mixtures

To complement the information on the competition study of PC_n toward Cd complexation, successive aliquots of Cd^{2+} are added to equimolar mixtures of GSH and PC_{2-5} (Fig. 3A–D). Total peptide concentration was 10^{-5} mol L^{-1}; therefore, each peptide was at 5×10^{-6} mol L^{-1} in the titration. The addition of Cd^{2+} to a solution containing only GSH (1×10^{-5} mol L^{-1}) is mentioned as "control" in the text (Fig. S1 in Supplementary material). This type of titration (i.e., a ligand mixture with a metal ion that is initially absent in solution) is of great interest because it allows us to simulate the behavior of a natural system when exposed to metal ion stress, or contamination. A comparison between each individual ligand titration and Cd^{2+} [19–22] shows that signal evolution is very similar to what is observed here for ligand mixtures (specifically reduction in potential values).

In the initial voltammogram, before metal ion addition, the presence of GSH (~ -0.57 V) and the respective PC_n (~ -0.69 V) is detected. GSH signal is much more intense than PC_n, although they are at the same concentration level. Variations in the initial voltammogram were verified depending on whether PC_n was added to GSH or the reverse procedure was done. If PC_n was added to GSH in solution, the signal of the smaller ligand suffers a displacement to more positive potential and its intensity increases. Only at great PC_n excess does a new peak appear at slightly more negative potentials than the previous ones, and it is possible to make a clear distinction between ligand signals. This displacement in potential axis was influenced by the chain length of the added PC_n. Therefore, the adopted methodology consisted of the addition of GSH to PC_n in solution, obtaining lower shifts in ligand signals.

As in Section 1 of Results and discussion, the most significant difference in reduction potentials was verified between Cd/PC_2 (Fig. 3A) and Cd/PC_3 (Fig. 3B). The difference between Cd/PC_{3-5} complexes (Fig. 3B–D) is very small (see Table S2). The great difference in this set of titrations concerns the ratio at which the GSH reduction peak decreases and the complexing capacity of the equimolar GSH/PC_n solutions. In both cases, the parameters increase with the chain length of the PC_n.

Successive additions of Cd^{2+} to the ligand mixture clearly produce three wide signals: (i) first, at potentials around -0.80 V for the PC_2 complexes or, in the case of Cd/PC_{3-5} complexes, at potential values slightly more negative ($E_p = -0.84$ V); (ii) on the stabilization of this signal, the emergence of a new signal that can be

Table 1
Component assignments in DPP/MCR–ALS experiments.

Component	Peak potential (V)	Electrochemical process	Description
1	$-0.44 < E < -0.54$	$Hg(GSH) + H^+ \rightarrow Hg^0 + HGSH$	Anodic signals of Hg in the presence of the uncomplexed GSH released from the Cd^{2+} complex
2	-0.62	$Cd^{2+} \rightarrow Cd(Hg)$	Free Cd^{2+} reduction
3	$-0.66 < E < -0.72$	$Hg(PC_n) + H^+ \rightarrow Hg^0 + HPC_n$	Anodic signals of Hg in the presence of PC_n in excess
4	-0.69	$Cd(GSH) \rightarrow Cd(Hg) + GSH$	Reduction of Cd^{2+} bound with GSH
5	$-0.80 < E < -0.86$	$Cd(PC_n) \rightarrow Cd(Hg) + PC_n$	Reduction of Cd^{2+} bound with one PC_n ($n = 2–5$)
6	-0.86	$Cd(PC_2)_2 \rightarrow Cd(Hg) + 2PC_2$	Reduction of Cd^{2+} bound with two PC_2

Note: Each component refers to an electrochemical process, not to a chemical species.

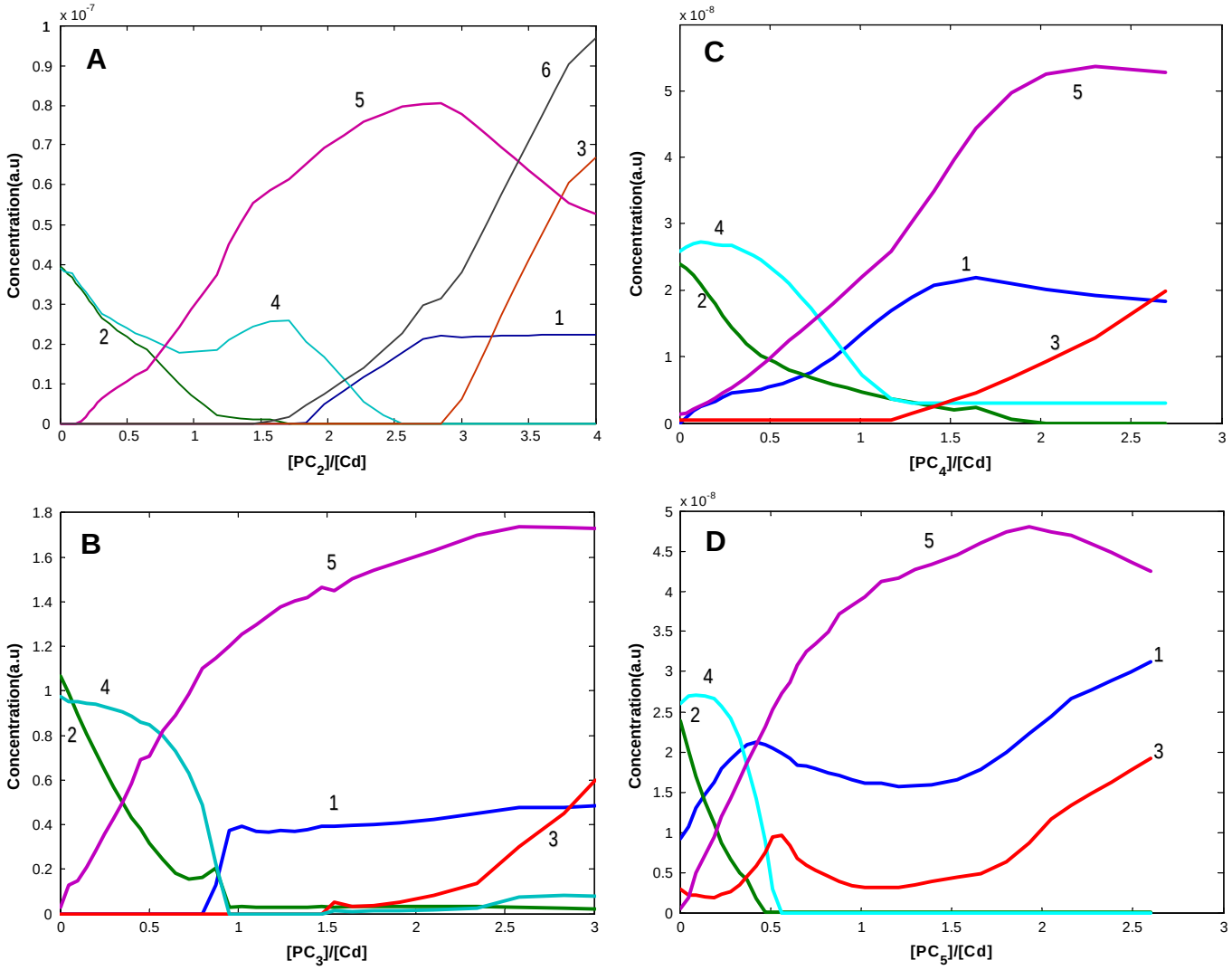


Fig. 2. Respective concentration profiles obtained in the MCR–ALS decomposition of the matrices data shown in Fig. 1A–D. Applied constraints were non-negativity and signal shape. The concentration profiles are plotted as a function of the respective added PC_n/total metal concentration ratio. Components are GSH (1), Cd^{2+} (2), PC_n (3), Cd/GSH complex (4, ML), and Cd/PC_n complexes (5 corresponds to ML for all PC_n, whereas 6 corresponds to ML_2 specifically in the titration with PC_2).

assigned to the formation of Cd/GSH complexes (E_p = −0.67 V); (iii) the last one that corresponds to the Cd^{2+} reduction peak (E_p = −0.62 V) in excess. Throughout titration, a fourth signal (close to −0.40 V) is also observable and can be assigned to the anodic process of Hg in the presence of Cd/PC_n complexes. This last signal is excluded from MCR–ALS treatment because nonrelevant information can be obtained from it.

Following the same criteria, and taking into account the initial estimation of components used to explain individual titrations [19–22], MCR–ALS produced variable, but reliable, resolution of the data matrix in Fig. 3 (with LOFs ranging between 9% and 25% [Table S2]) when the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals) and signal shape (for voltammograms of all components) are applied. Due to extensive data, and for the sake of simplicity, we present only the evolution of Cd^{2+} (component at −0.62 V [Fig. 4]) and GSH reduction peaks (component at −0.57 V [Fig. S2]) in the data set.

Fig. 4 represents what is usually defined as the metal complexing capacity curves for these peptide mixtures. It is a common application of voltammetry in the study of metal complexation, which measures the ability of ligands to complexation with metal ions. Peak currents will be higher, for a given concentration of M^{n+} added (titrant) to ligand solution, when ligands have saturated their binding sites for additional M^{n+}, that is, when the complexing capacity is reached. The slope of the upper portion of the titration curve is identical to the slope of the titration curve obtained in the absence of ligand. Interception of the linear titration curves gives an estimate measure of the ligand complexing capacity. Table S3 summarizes the results of the linear regression of the upper linear part of the titration—where an excess of M^{n+} titrant is present. As expected, it was observed that a progressive increment in the complexing capacity of these ligand mixtures with the chain length and the number of the binding sites of the PC_n cotitrated. In Fig. 4, the peak intensity of component related to reduction of Cd^{2+} in excess (E = −0.62 V) is represented in front of the Cd^{2+}/GSH concentration ratios: initial [GSH] = 5×10^{-6} mol L^{-1}. The addition of Cd^{2+} to a GSH solution is mentioned as control both in the text and in Fig. 4 (GSH is in fact PC_1).

The GSH concentration profiles (component 1 at −0.57 V) of the addition of Cd^{2+} to 1:1 GSH/PC_{2-5} solutions (Fig. S2) reveal that the profile changes with the number of binding sites of the PC_n in solution (cotitrated). The GSH profile in the presence of PC_2 resembles that of control, but from then onward the curve changes from an exponential decrease to an asymmetric sigmoid curve. Moreover,

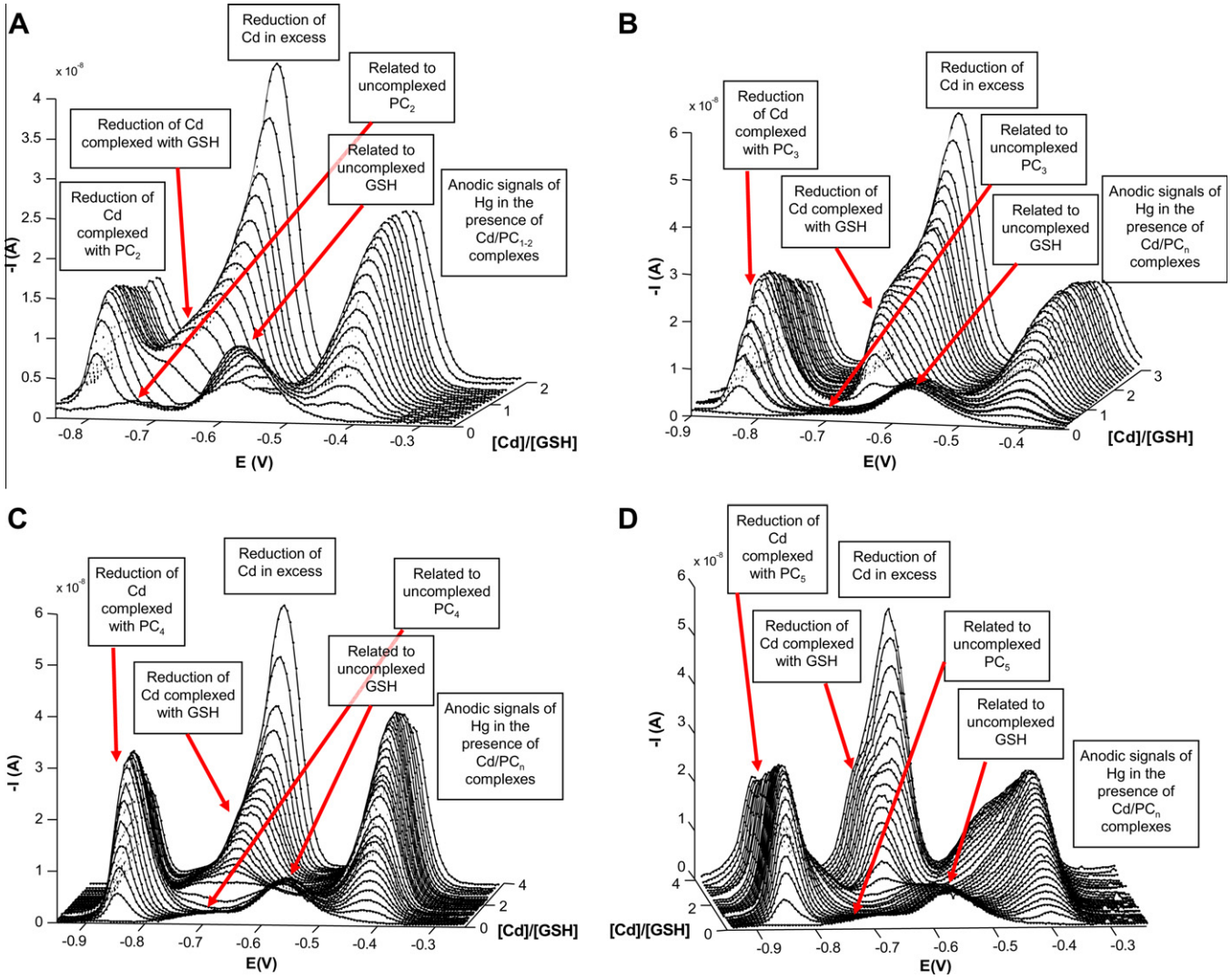


Fig. 3. Evolution of DPP curves (current vs. potential) along Cd^{2+} additions to 1:1 GSH/PC_n solutions (5×10^{-6} mol L^{-1}): (A) PC_2; (B) PC_3; (C) PC_4; (D) PC_5. All experiments were performed at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer in the presence of KNO_3 (0.1 mol L^{-1}). The third axis indicates the ratio between the added Cd and GSH present in solution. The boxes summarize the process associated with every signal.

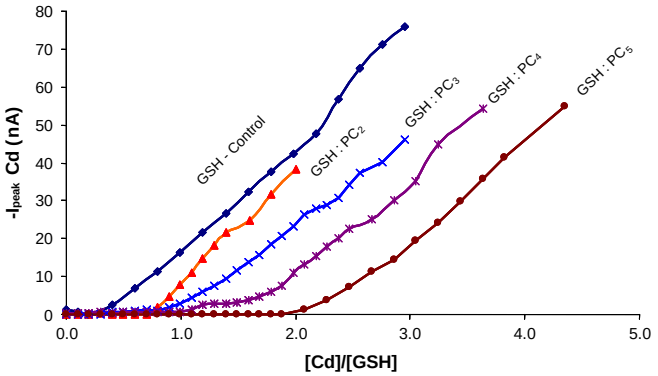


Fig. 4. Peak current of Cd^{2+} reduction obtained in the MCR–ALS decomposition of the data matrices from Figs. 3 and S1 as a function of the Cd/GSH ratios. Applied constraints were non-negativity, signal shape, and selectivity for ligands at the beginning of the titration.

it is observable that a superior plateau remains until all PC_n are complexed with the added Cd^{2+}. In some cases, the GSH component does not reach a null value mainly to overlapping with other signals related to the anodic oxidation of Hg in the presence of Cd/PC_n complexes as well as the excess of Cd^{2+} in solution (at the end of the titration).

It cannot be excluded to some extent that, within the transfer of Cd^{2+} ions from the GSH complex, the formation of a transitional mixed ligand–metal complex occurs. Nevertheless, no voltammetric evidence of such complex was found. Spectroscopic data by other authors for Pb–PC_n [28], Hg–PC_n [29], and Cu–PC_n [30] led to conclusions that the relative affinity of these metals toward

Table 2
Conditional stability constants for Cd complexes with PCs.

	Section 1		Section 2	
	ΔE (V)	log K'	ΔE (V)	log K'
GSH	0.07	2.5	0.07	2.3
PC_2	0.21	7.2	0.17	5.9
PC_3	0.24	8.3	0.20	7.0
PC_4	0.24	8.2	0.22	7.5
PC_5	0.24	8.3	0.22	7.7

Note: All experiments were performed at pH 7.5 in 0.1 mol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer in the presence of KNO_3 (0.1 mol L^{-1}).

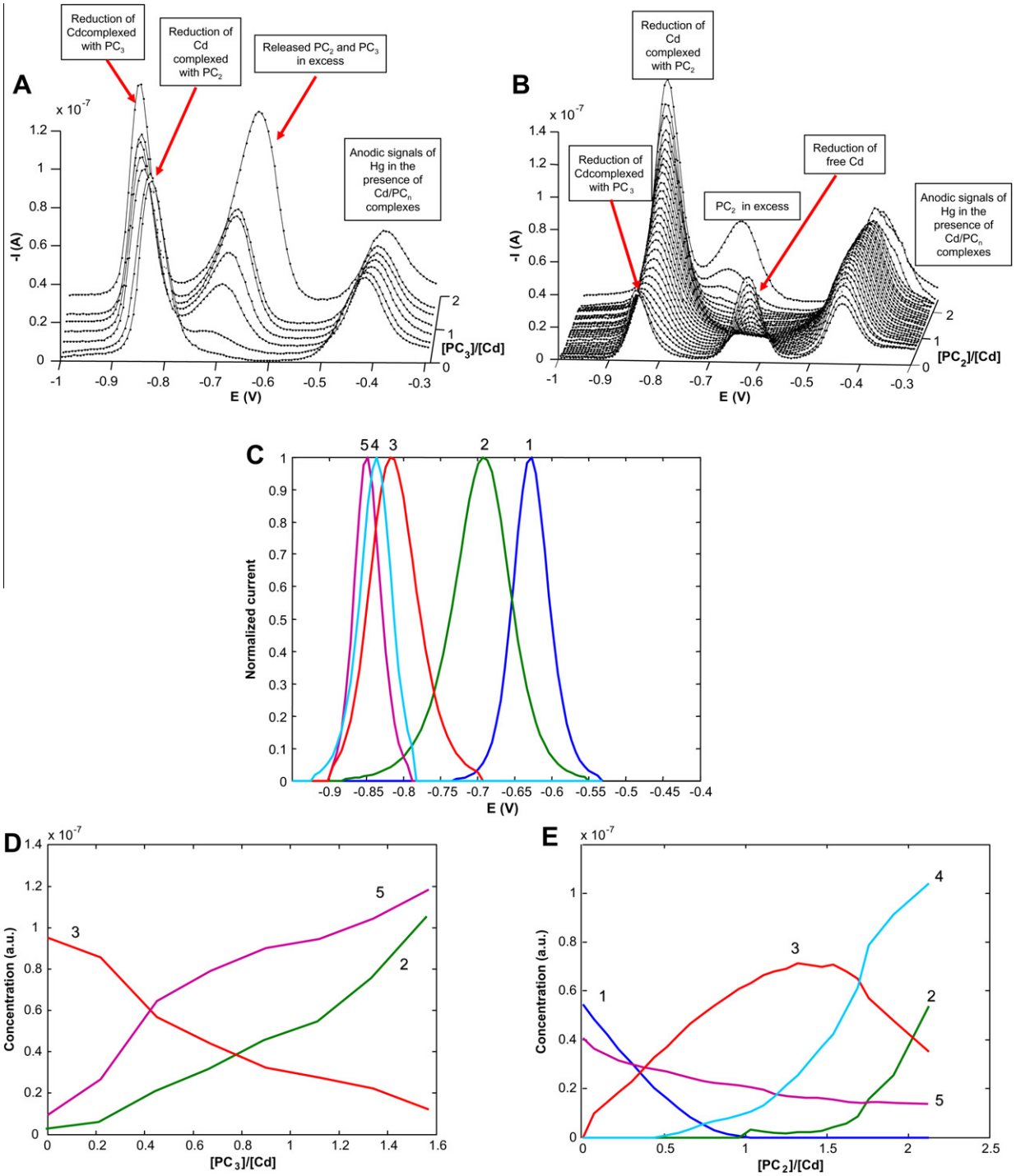


Fig. 5. Evolution of DPP curves along PC_3 or PC_2 additions to Cd/PC_2 or Cd/PC_3 solutions, respectively, in 0.1 mol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer (pH 7.5). (A) PC_3 is added to a 1:1 Cd/PC_2 solution. (B) PC_2 is added to a 1:3 Cd/PC_3 solution. The third axis indicates the ratio between the added PC_n and Cd present in solution. The boxes summarize the process associated with every signal. (C–E) Common unitary voltammograms (C) and concentration profiles (D and E) obtained in the MCR–ALS decomposition of the data matrices shown in panels A and B. Applied constraints were non-negativity and signal shape. The concentration profiles are plotted as a function of the added PC_n/Cd^{2+} concentration ratios. Components are Cd^{2+} (1), PC_n (2), Cd/PC_2 complexes (3 and 4), and Cd/PC_3 complexes (5).

Cys-rich peptides is directly dependent on the chain length ($GSH < PC_2 < PC_3 < PC_4$). The results reported here for Cd raise the question of whether there is a limiting number of thiol groups in PC_n that, although providing a larger binding capacity toward metals (specifically Cd^{2+}), does not provide greater stability constants to the complexes.

For PC_{1-3}, longer peptides easily displace Cd^{2+} ions from their complexes with shorter ones, and the new complexes are more stable, as suggested by the more negative peak potentials of their reduction signals. As expected, the inverse process (i.e., the displacement of metal ions from long to short chain peptides) is not observed.

For PC_{3-5}, the signals of $Cd–PC_n$ complexes are very similar. This seems to suggest that metal binding is determined more by the nature of the functional groups directly involved in the binding process than by the whole molecule; the metal ion coordination

Table 3
Component assignment in DPP/MCR–ALS experiments.

Component	Peak potential (V)	Electrochemical process	Description
1	−0.62	$Cd^{2+} \rightarrow Cd(Hg)$	Free Cd^{2+} reduction
2	−0.69	$Hg(PC_{2-3}) + H^+ \rightarrow Hg^0 + HPC_{2-3}$	Anodic signals of Hg in the presence of the uncomplexed PC_{2-3}, PC_2 released from the Cd^{2+} complex, and/or PC_{2-3} in excess
3	−0.82	$Cd(PC_2) \rightarrow Cd(Hg) + PC_2$	Reduction of Cd^{2+} bound with one PC_2
4	−0.85	$Cd(PC_2)_2 \rightarrow Cd(Hg) + 2PC_2$	Reduction of Cd^{2+} bound with two PC_2
5	−0.86	$Cd(PC_3) \rightarrow Cd(Hg) + PC_3$	Reduction of Cd^{2+} bound with one PC_3

Note: Each component refers to an electrochemical process, not to a chemical species.

sphere becomes very similar. This could be also related to the fact that at $n \geqslant 4$ the number of thiol groups in the peptide can "saturate" the coordination number of Cd^{2+} (typically tetrahedral). Anyway, the coincidence mentioned in the signal positions hindered a more rigorous study on the metal exchange between peptides with $n \geqslant 3$.

Nevertheless, the increase of n produces an increase of the number of metal ions that can be bound to a PC_n molecule. This could mean that when a large excess of metal ions is added, they are bound by a minimal of thiol groups, so that the quantity of metals that can be bound depends on the quantity of thiol groups. These observations are reinforced by the conditional stability constants (Table 2) obtained from a Nernst equation (for further details, see "Data Treatment" Section in Supplementary material). With respect to Section 1 above, results evidence a gradual log K' increase from a single thiol group (GSH, log $K = 2.5$) to three thiol groups (PC_3, log $K = 8.3$). The log K' differences for longer chain length ligands (from PC_3 to PC_5) are very small (<1 unit). A similar tendency is verified for log K' calculated for Section 2, although they are somewhat smaller. One possible explanation could be the type of titration; in Section 1, PC_n is added to a Cd/GSH solution, whereas in Section 2, Cd is added to a ligand mixture.

$Cd^{2+}/PC_2/PC_3$ system

To obtain more accurate information on Cd^{2+} behavior in the presence of two different PC_n (with $n > 1$), different exchange experiments were performed: (i) a titration of an equimolar Cd/PC_2 solution with PC_3 (Fig. 5A) and (ii) a titration of a 3:1 Cd/PC_3 solution with PC_2 (Fig. 5B). In the first case, before PC_3 additions, all Cd^{2+} ions are complexed by PC_2. The successive additions of PC_3 allow us to confirm the transfer of Cd^{2+} ions to longer chain PC_n. In the second situation, Cd^{2+} ions are initially present in the free form as well as complexed with PC_3, and this may allow us to determine whether Cd^{2+} transfer can occur from longer to smaller chain PC_n or, alternatively, some transient mixed PC_n metal complex is formed. Table 3 summarizes the main characteristics of the electrochemical components and involved processes.

The MCR–ALS analysis of data confirms these facts. Thus, the best results (common pure voltammograms in Fig. 5C and concentration profiles in Fig. 5D [with an 18.60% LOF] or in Fig. 5E [with a 9.60% LOF]) were achieved by (i) applying the constraint of non-negativity for both concentrations and signals, (ii) forcing the Cd^{2+} concentration (component 1, second titration) to be zero at the end of the titration, and (iii) applying the constraint of signal shape for all components. Component 2 corresponds to the PC_n excess (which could not be differentiated individually), whereas components 3 and 4 are associated with successive Cd^{2+}/PC_2 complexes (ML and ML_2, respectively). Component 5 is related to the reduction of Cd^{2+} bound to PC_3.

From concentration profiles in Fig. 5D, it seems that the addition of PC_3 to the Cd/PC_2 complex (component 3) in solution is consistent with the formation of Cd/PC_3 complex, indicating a total transfer of Cd^{2+} from the shorter chain PC_n to the longer chain PC_n. Moreover, from the initial additions of PC_3, the component 2 (free PC_n) increases its value, and this is an indicator that PC_2 is being released from its metal complex. Concentration profiles in Fig. 5E suggest that a negligible transfer of Cd^{2+} occurs from longer chain PC_n to shorter chain PC_n, although transient complexes cannot be totally excluded.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (project CTQ2009-09471). Rui Gusmão thanks the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for his PhD grant (BES-2007-15385).

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.ab.2010.06.034.

References

[1] U. Krämer, Phytoremediation: novel approaches to cleaning up polluted soils, Curr. Opin. Biotechnol. 16 (2005) 133–141.
[2] L. Sanità di Toppi, R. Gabriell, Response to cadmium in higher plants, Environ. Exp. Bot. 41 (1999) 105–130.
[3] E. Pilon-Smits, Phytoremediation, Annu. Rev. Plant Biol. 56 (2005) 15–39.
[4] J.L. Hall, Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance, J. Exp. Bot. 53 (2002) 1–11.
[5] S.M. Spain, D.L. Rabenstein, Characterization of the acid/base and redox chemistry of phytochelatin analogue peptides, Anal. Chem. 75 (2003) 3712–3719.
[6] Y. Cheng, Y.-B. Yan, J. Liu, Spectroscopic characterization of metal bound phytochelatin analogue $(Glu\text{-}Cys)_4$-Gly, J. Inorg. Biochem. 99 (2005) 1952–1962.
[7] P. Leverrier, C. Montigny, M. Garrigos, P. Champeil, Metal binding to ligands: cadmium complexes with glutathione revisited, Anal. Biochem. 371 (2007) 215–228.
[8] A. Bräutigam, D. Schaumlöffel, G.-J. Krauss, D. Wesenberg, Analytical approach for characterization of cadmium-induced thiol peptides: a case study using *Chlamydomonas reinhardtii*, Anal. Bioanal. Chem. 395 (2009) 1737–1747.
[9] H. Chassaigne, V. Vacchina, R. Lobinski, Elemental speciation analysis in biochemistry by electrospray mass spectrometry, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 300–313.
[10] P.C. White, N.S. Lawrence, J. Davis, R.G. Compton, Electrochemical determination of thiols: a perspective, Electroanalysis 14 (2002) 89–98.
[11] V. Supalkova, D. Huska, V. Diopan, P. Hanustiak, O. Zitka, K. Stejskal, J. Baloun, J. Pikula, L. Havel, J. Zehnalek, V. Adam, L. Trnkova, M. Beklova, R. Kizek, Electroanalysis of plant thiols, Sensors 7 (2007) 932–959.
[12] J. Petrlova, S. Krizkova, O. Zitka, J. Hubalek, R. Prusa, V. Adam, J. Wang, M. Beklova, B. Sures, R. Kizek, Utilizing a chronopotentiometric sensor technique for metallothionein determination in fish tissues and their host parasites, Sens. Actuat. B 127 (2007) 112–119.
[13] A. González-Bellavista, S. Atrian, M. Muñoz, M. Capdevila, E. Fàbregas, Novel potentiometric sensors based on polysulfone immobilized metallothioneins as metal-ionophores, Talanta 77 (2009) 1528–1533.
[14] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, Chemometrics for the analysis of voltammetric data, Trends Anal. Chem. 25 (2006) 86–92.
[15] Y. Ni, S. Kokot, Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis? Anal. Chim. Acta 626 (2008) 130–146.
[16] A. de Juan, R. Tauler, Multivariate curve resolution (MCR) from 2000: progress in concepts and applications, Crit. Rev. Anal. Chem. 36 (2006) 163–176.

[17] A. Alberich, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Combined use of the potential shift correction and the simultaneous treatment of spectroscopic and electrochemical data by multivariate curve resolution: analysis of a Pb(II)–phytochelatin system, Analyst 133 (2008) 470–477.
[18] M.S. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, Cadmium-binding properties of glutathione: a chemometrical analysis of voltammetric data, J. Inorg. Biochem. 66 (1997) 29–33.
[19] M.J. López, C. Ariño, S. Díaz-Cruz, J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, Voltammetry assisted by multivariate analysis as a tool for speciation of metallothioneins: competitive complexation of α- and β-metallothionein domains with cadmium and zinc, Environ. Sci. Technol. 37 (2003) 5609–5616.
[20] A.M. Garrigosa, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, Comparison of differential pulse and alternating current polarography in the soft-modelling study of the complexation of Cd(II) by the fragment Cys-Gly and by the phytochelatin $(\gamma\text{-Glu-Cys})_2$Gly, Anal. Bioanal. Chem. 391 (2008) 2209–2218.
[21] B.H. Cruz, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Complexation of heavy metals by phytochelatins: voltammetric study of Cd^{2+} and Zn^{2+} ions by phytochelatin $(\gamma\text{-Glu-Cys})_3$-Gly assisted by multivariate curve resolution, Environ. Sci. Technol. 39 (2005) 778–786.
[22] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Competitive binding of Cd and Zn with the phytochelatin $(\gamma\text{-Glu-Cys})_4$-Gly: comparative study by mass spectrometry, voltammetry–multivariate curve resolution, and isothermal titration calorimetry, Environ. Sci. Technol. 42 (2008) 2860–2866.
[23] R. Gusmão, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Competitive binding of cadmium by plant thiols: an electrochemical study assisted by multivariate curve resolution, Anal. Bioanal. Chem. 394 (2009) 1137–1145.
[24] R. Gusmão, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, Cadmium binding in mixtures of phytochelatins and their fragments: a voltammetric study assisted by multivariate curve resolution and mass spectrometry, Analyst 135 (2010) 86–95.
[25] C.M.M. Machado, I. Cukrowski, H.M.V.M. Soares, Complex formation in the region of metal hydrolysis and $M(OH)_2$ precipitation: a glass electrode potentiometric and polarographic study of Cd–$(AMPSO)_x$–$(OH)_y$ and Zn–$(AMPSO)_x$–$(OH)_y$ systems, Electroanalysis 18 (2006) 719–729.
[26] The MathWorks, MATLAB version 7.3.0.267, The MathWorks, Natick, MA, 2006.
[27] T.-Y. Yen, J.A. Villa, J.G. DeWitt, Analysis of phytochelatin–cadmium complexes from plant tissue culture using nano-electrospray ionization tandem mass spectrometry and capillary liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, J. Mass Spectrom. 34 (1999) 930–941.
[28] R.K. Mehra, V.R. Kodati, R. Abdullah, Chain length dependent Pb(II) coordination in phytochelatins, Biochem. Biophys. Res. Commun. 215 (1995) 730–736.
[29] R.K. Mehra, J. Miclat, V.R. Kodati, R. Abdullah, T.C. Hunter, Optical spectroscopic and reverse-phase HPLC analyses of Hg(II) binding to phytochelatins, Biochem. J. 314 (1996) 73–82.
[30] R.K. Mehra, P. Mulchandani, Glutathione-mediated transfer of Cu(I) into phytochelatins, Biochem. J. 307 (1995) 697–705.

Supplementary Data

Electrochemical Survey of the Chain Length Influence in Phytochelatins Competitive Binding by Cadmium

Rui Gusmão, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz and Miquel Esteban*

Departament de Química Analítica. Facultat de Química Universitat de Barcelona

Martí i Franquès 1 - 11, E - 08028 - Barcelona (Spain)

Phone: (+34) 93 403 91 17. Fax: (+34) 93 402 12 33. e-mail: miquelestebanc@ub.edu

*to whom correspondence should be addressed

Data Treatment

Besides the possible stoichiometries of the complexes, it would be interesting to extract from MCR-ALS results some quantitative information about the equilibria involved. The binding between Cd and Cys-rich peptides occurs manly through thiol group, yielding inert electroactive complexes with well-defined signals, whose evolution can be used to calculate equilibrium parameters.

A first possible approach consists of the estimation of every equilibrium constant point by point along the titration, using as the concentration of each species the values of the concentration profile of the component (or components) related to the species. However, this method appeared to be unsuccessful, because of very sharp concentration profiles, which made the calculations impossible.

A second possible approach is based on the differences between the reduction peak potentials of unitary voltammograms (results for first and second sections are shown in table 2). They can be related to conditional equilibrium constant K' through the Nernst equation, written in the form of electrode potentials. Thus, for electrochemical half-reactions of the type (at 25ºC):

$$M + 2e^- \rightarrow M(Hg) \quad (1)$$

$$ML + 2H^+ + 2e^- \rightarrow M(Hg) + H_2L \quad (2)$$

$$\Delta E = E_2^0 - E_1^0 \quad (3)$$

$$\log K' = \frac{nF}{RT}|\Delta E| \quad (4)$$

Where E_1^0 and E_2^0 are the standard potential of process (1) and (2) respectively, which can be estimated from the corresponding peak potential. Indeed, this is an overestimation of the stability constant, since ΔE has not only a thermodynamic component but also a kinetic contribution of the usually irreversible metal complex reduction.

Table S1 – Characteristic peak potential values of each electrochemical process involved during the additions of PC_n to a 2:1 Cd^{2+}: GSH solution.

		Electrochemical Process				
		E_i (V)		E_f (V)		
Iof (%) in MCR-ALS	Added PC_n	Cd^{2+}	Cd/GSH	GSH	PC_n	Cd/PC_n
16.27	PC_2	-0.622	-0.694	-0.539	-0.658	-0.831
15.59	PC_3		-0.686	-0.539	-0.711	-0.862
18.48	PC_4		-0.693	-0.465	-0.718	-0.859
21.25	PC_5		-0.688	-0.443	-0.693	-0.864
	ΔE_{max} (mV)	0	11.9	95.9	60.0	33.5

Table S2 – Characteristic peak potential values of each electrochemical process involved during the additions of Cd^{2+} to equimolar GSH: PC_{2-5} solutions.

	Electrochemical Process E_p(V)					
Solution	GSH	Cd	PCn	Cd/GSH	Cd/PCn	Iof (%)
Control	-0.587	-0.622	-	-0.688	-	8.98
GSH : PC_2	-0.572		-0.703	-0.674	-0.793	24.62
GSH : PC_3	-0.573		-0.693	-0.673	-0.824	22.21
GSH : PC_4	-0.572		-0.683	-0.668	-0.839	25.25
GSH : PC_5	-0.577		-0.698	-0.668	-0.844	13.24
ΔE_{max} (mV)	20	0	20	6	50	

Table S3 – Linear regression results of the free Cd^{2+} reduction signals during the additions of Cd^{2+} to equimolar GSH: PC_{2-5} solutions (complexing capacity refers to [Cd]/[GSH] ratio).

Solution	Slope		Intercept		Complexing Capacity		Adjusted R^2
Control	29.50	(± 0.48)	-13.59	(± 0.46)	0.47	(± 0.01)	0.999
GSH : PC_2	29.80	(± 0.94)	-21.35	(± 1.32)	0.72		0.992
GSH : PC_3	24.10	(± 0.46)	-21.95	(± 0.93)	0.91		0.994
GSH : PC_4	25.55	(± 0.83)	-40.48	(± 2.13)	1.58		0.987
GSH : PC_5	25.86	(± 0.69)	-58.38	(± 2.31)	2.26		0.994

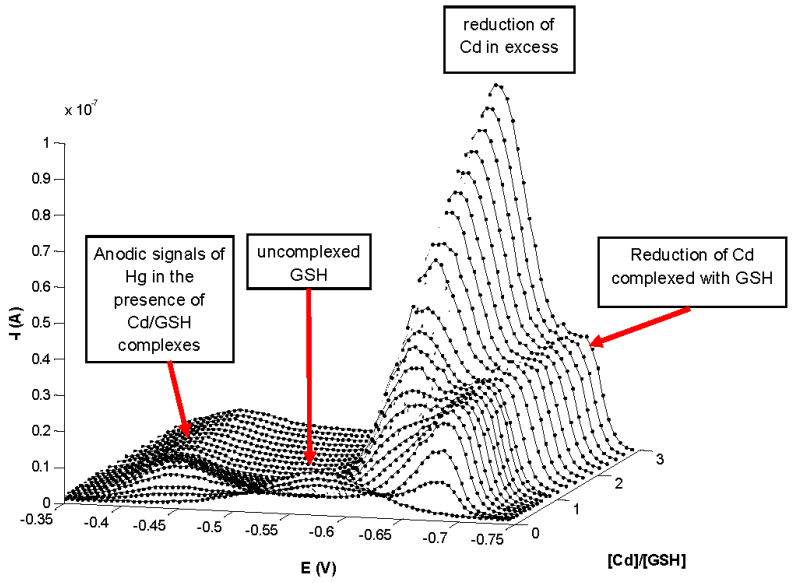


Figure S1 – A 3D representation of the original data mentioned as "control" in section 3.2. Evolution of DPP curves (current vs potential) along Cd additions to GSH solutions ($1x10^{-5}$ mol L^{-1}), in 0.1 mol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer (pH 7.5).The third axis indicates the ratio between the added Cd and GSH in solution. The boxes summarize the process associated with every signal. Please note that the potential axis is inverted to allow a better appreciation of signal evolution.

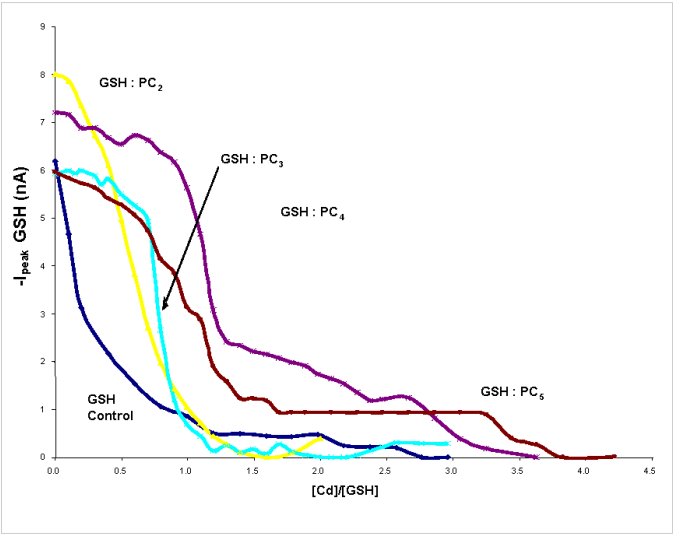


Figure S2 - Concentration profiles of GSH component obtained in the MCR-ALS decomposition of the data matrices in "control" and Figures 3a-d. Applied constrains were non negativity, signal shape and selectivity for ligands at the beginning of the titration. The concentration profiles are plotted as function of the added Cd^{2+}-to-GSH concentration ratios.

6.5 Discusión de resultados

En el conjunto de trabajos agrupados en el presente Capítulo de la tesis se han estudiado diversos sistemas de competición de ligandos para la complejación del ión Cd^{2+}:

i) Sistemas con ligandos con un grupo tiol: Cys/Cys-Gly (apartado 6.2);
ii) Sistemas con un ligando con un grupo tiol y una fitoquelatina (varios tioles): Cys-Gly/PC_2 y Cys/PC_3 (apartado 6.3) y GSH/PC_n (apartado 6.4);
iii) Sistemas con ligandos con múltiples grupos tioles: PC_2/PC_3 (apartado 6.4).

En el estudio de todos los sistemas se han llevado a cabo sistemáticamente valoraciones voltamperométricas (mediante DPP) de soluciones del ión Cd^{2+} con los ligandos, o mezclas de ligandos, correspondientes. En estas valoraciones directas, existen tres tipos de señales distintas:

i) un pico de referencia que corresponde al proceso de reducción del Cd^{2+} no complejado, a *ca.* -0.64 V;
ii) los picos de reducción de los diferentes complejos metálicos, que aparecen a potenciales más negativos;
iii) las señales anódicas del ligando en exceso y de los complejos metálicos. Todas ellas aparecen a potenciales más positivos.

Para el conjunto de sistemas se han estudiado cuatro situaciones iniciales de valoraciones directas (adición del ligando a la disolución de Cd^{2+}). El tratamiento de las matrices de datos voltamperométricos con MCR-ALS permite obtener los perfiles de concentración para cada situación.

Los estudios y los resultados más significativos se pueden agrupar y sintetizar de la siguiente forma:

i) Adición del ligando de cadena más corta a la disolución de Cd^{2+} totalmente complejado con el ligando de cadena mas larga o de mayor contenido de grupos tiol. En estos casos se observó que los complejos del Cd^{2+} previamente formados en solución (con señales a E< -0.70 V, ML_2) no sufren ningún cambio con las sucesivas adiciones del ligando de cadena mas corta. Consecuentemente, se observa el crecimiento de la señal anódica correspondiente al incremento de la concentración del ligando no complejado (a E> - 0.64 V), además de alguna distorsión de la línea base. Esto se observó en los trabajos de los apartados 6.2 (Figura 2a) y 6.4 (Figura 5a);

ii) Adición del ligando de cadena más larga a la disolución de Cd^{2+} complejado totalmente con el ligando de cadena más corta. Al revés de la situación anterior, en la fase inicial de la valoración se observó que las señales de los complejos de Cd^{2+} previamente formados en solución (ML_2, a E≤ -0.70 V) sufren una disminución progresiva al mismo tiempo que crece un pico, a potenciales más negativos (E< -0.75 V), que corresponde a la formación del complejo 1:1 M:L con el ligando de cadena más larga. En la fase final de la valoración tiene lugar la formación del complejo ML_2 (E≤ -0.60 V). A lo largo de la valoración se observa el crecimiento de las señales anódicas correspondientes al ligando de cadena más

corta, que es desplazado del complejo metálico, y posteriormente al exceso de ligando añadido a la solución (E> - 0.64 V). Debido a que las señales anódicas de los ligandos están bastante solapadas, y ocurre un desplazamiento constante en sus potenciales de reducción, no se ha logrado su resolución mediante MCR-ALS (*e.g.*, ver apartado 6.3, Figura 3a). Además, en este intervalo de potenciales se solapan también algunas señales anódicas de los complejos metálicos (E> -0.5 V). Debido a ello en algunos casos se eliminaron de la matriz de datos los valores correspondientes a estos potenciales menos negativos (*e.g.*, ver apartado 6.3, Figura 7) o bien se atribuyó la evolución de datos de esa zona a una señal anódica conjunta para este tipo de señales (*e.g.*, ver apartado 6.2, Figura 1e);

iii) Adición del ligando de cadena más larga a una disolución en la que hay Cd^{2+} libre (señal a E~ -0.64 V) y Cd^{2+} parcialmente complejado con un ligando de cadena más corta (formando la especie ML, E< -0.65 V). Las adiciones sucesivas del ligando de cadena más larga llevan a la desaparición de estas señales, pero no de forma simultánea, como se puede verificar en los perfiles de concentración (*e.g.*, apartado 6.4, Figura 2). Esto es debido a la formación de los sucesivos complejos con el ligando de cadena más larga (E< -0.75 V). El componente que corresponde al Cd^{2+} libre disminuye de una forma más acentuada que su complejo metálico con el ligando de cadena más corta. Esto se debe a que inicialmente es más fácil enlazar el Cd^{2+} libre que desplazarlo del complejo con el ligando más débil. Cuando el ligando de cadena más corta es desplazado del complejo su señal empieza a crecer, a potenciales menos negativos (E> -0.6 V; seguro), y en la parte final de la valoración ocurre la evolución del componente asignado al exceso de ligando libre añadido. Para el sistema Cd/GSH/PC_n (apartado 6.4) las señales anódicas se consiguen diferenciar de forma clara y los dos componentes fueron atribuidos a cada uno de los ligandos. Los cambios de forma, desplazamientos laterales y solapamiento con las señales anódicas de los complejos metálicos explican el incremento del valor de *lof* (entre 15 y 21%);

iv) Adición del ligando de cadena más corta a una disolución en la que hay Cd^{2+} libre (E~ -0.64 V) y Cd^{2+} parcialmente complejado con un ligando de cadena más larga (formando la especie ML, E< -0.75 V). Las adiciones sucesivas del ligando de cadena más corta causan la disminución de la señal de reducción del Cd^{2+} libre, formándose nuevos complejos con el ligando añadido. Igual que en el primer caso, el complejo metálico inicial con el ligando de cadena más larga no sufre perturbaciones por la presencia del nuevo ligando de cadena más corta o su respectivo complejo con Cd^{2+}. En el sistema Cd/Cys/PC_3 (apartado 6.3, Figuras 7b y 6b) esto ocurre de forma bastante clara. El componente 6, asignado a Cd-PC_3 (ML) es constante en el perfil de concentraciones. Para los demás casos las señales de los diferentes complejos se solapan bastante y son de interpretación más difícil, como en el sistema Cd/Cys/Cys-Gly (apartado 6.2, Figura 1.d y 2. d). La resolución de las matrices de datos con MCR-ALS indica que el componente del complejo con el ligando de cadena más larga sufre cambios mínimos, que se deben fundamentalmente a los cambios en la línea base y al mencionado solapamiento de señales. Una vez todo el Cd^{2+} está complejado, aparece el exceso de ligando añadido, a potenciales más positivos (E< -0.65 V).

6.6 Referencias

1. Szpunar, J., *Analyst* **2000,** *125* (5), 963-988.
2. Szpunar, J., *Analyst* **2005,** *130* (4), 442-465.
3. Cruz-Vásquez, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M.; Tauler, R., *Analyst* **2002,** *127* (3), 401-406.
4. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2007,** *584* (2), 403-409.
5. Garrigosa, A. M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2008,** *391* (6), 2209-2218.
6. Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2005,** *39* (3), 778-786.
7. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2008,** *42* (8), 2860-2866.
8. Alberich, A.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2008,** *133* (1), 112-125.

Capítulo 7

Estudio combinado de la complejación de Cd^{2+} y Pb^{2+} con la fitoquelatina PC_5 mediante DPP/CD – MCR-ALS y ESI-MS

7.1 Introducción

El estudio del efecto combinado de la presencia de los metales pesados en sistemas naturales ha sido objeto de diversas investigaciones. A modo de ejemplo representativo, el análisis de la microalga marina *Phaeodactylum tricornutum*, mediante RP-HPLC y AAS, expuesta a concentraciones elevadas de Cd^{2+} y Pb^{2+} reveló que el mayor porcentaje de Cd^{2+} complejado estaba distribuido entre las PC_2-PC_4, mientras el Pb^{2+} estaba enlazado pricipalmente con la PC_2 [1]. Se han detectado complejos hasta con las PC_5 y la PC_6.

En otro estudio genético en que la micorriza *Cajanus cajan* fue sometida a tratamientos de estrés con Cd y Pb [2], se verificó que el Cd^{2+} era más tóxico que el Pb^{2+} y que sus combinaciones llevan a inhibiciones sinérgicas del crecimiento y a la inhibición del potencial de fijación del nitrógeno. La exposición a Cd^{2+} y Pb^{2+} aumentó significativamente los niveles de PC_n.

Este Capítulo presenta los resultados obtenidos en los estudios de la complejación competitva del Cd^{2+} y Pb^{2+}, dos de los metales pesados más tóxicos, con la fitoquelatina PC_5, mediante diversas técnicas analíticas complementarias, e introduciendo en esta tesis el uso del Dicroísmo Circular (CD). A través de las valoraciones polarográficas se obtuvo información del proceso de complejación en diferentes situaciones iniciales. Además, se han realizado mediciones mediante ESI-MS lo que permitió confirmar las estequiometrías de las especies formadas. Este trabajo justifica un capítulo a parte, una vez que se trata de complejación competitiva entre iones metálicos en presencia de una fitoquelatina con un elevado número de grupos tioles (5), situación inversa de los trabajos en el Capítulo 6.

7.2 Circular Dichroism and Voltammetry, assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC_5

En el presente articulo se aplica DPP en combinación con CD al estudio de la complejación competitiva entre Cd^{2+} y Pb^{2+}, dos iones extremadamente tóxicos, en presencia de la PC_5. Las estequiometrias de los complejos fueron determinados por ESI-MS.

En trabajos anteriores del grupo de Electroanálisis se han estudiado algunos sistemas de competición con iones metálicos (Cd y Zn) por un ligando tiol. Los experimentos de competición de Cd^{2+} y Zn^{2+} con PC_3 [3] y PC_4 [4] produjeron resultados muy comparables a los obtenidos en trabajos anteriores con MT y sus dominios α y β [5]. La introducción de un segundo metal (diferente) desestabiliza los enlaces del primer metal (previamente enlazado con el ligando), y el metal entrante no puede llegar a una situación tan estable como si entrara en la molécula libre. En algunos casos, el metal que entra desplaza el metal existente.

En todos estos sistemas, con señales muy solapadas, ha sido muy útil el uso de MCR-ALS con restricción de forma y matrices aumentadas. Por otra parte, el análisis de matrices de datos de valoraciones de complejación del ión Pb con tioles encierra en si misma algunas dificultades ya sea por la pérdida de linealidad, la pérdida de reversibilidad y/o la aparición de señales solapadas [6]. Las dificultades mencionadas llevaron a desarrollar en el grupo nuevas herramientas para el tratamiento de los datos voltamperométricos, como son los programas *shiftfit* [3], *pHfit* [7] y GPA [8]. Por otra parte, estas mismas dificultades llevaron a la búsqueda de técnicas que fueran

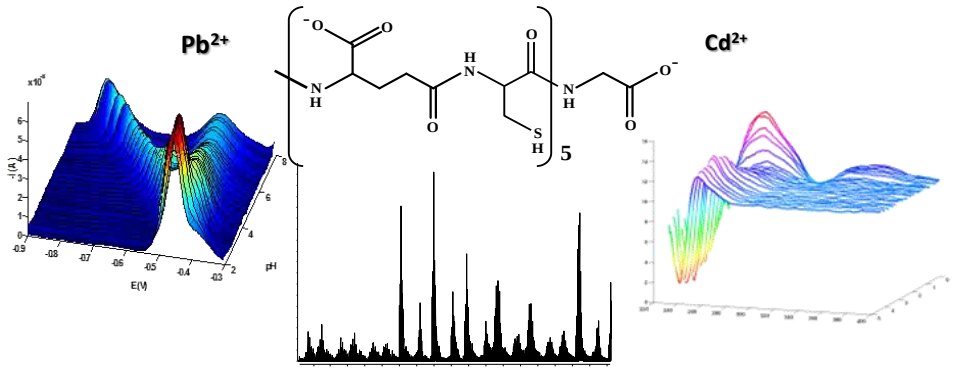
complementarias, al mismo tiempo que comparables, como es el CD. Esto permite la posibilidad del tratamiento conjunto de matrices DPP-CD con MCR-ALS [3, 9], y comparación de resultados con ESI-MS [10] o ITC [4].

En un primer apartado se analizan las señales de la PC_5 sola y en presencia de un ión metálico en un amplio intervalo de pH. El tratamiento de la matriz de datos se han hecho con el programa *pHfit* [7], que es capaz de resolver matrices que contienen señales solapadas que se desplazan a lo largo del eje de potenciales en una valoración de pH. Para el análisis de la complejación competitiva se aplicó el programa GPA (*shift*) debido a las dificultades ya descriptas.

Circular Dichroism and Voltammetry, assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC_5

Gusmão, R.; Cavanillas, S.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.

Analytical Chemistry, 82(21), 9006 - 9013 (2010).



Anal. Chem. **2010,** *82,* 9006–9013

Circular Dichroism and Voltammetry, Assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the Competitive Metal Binding by Phytochelatin PC_5

Rui Gusmão, Santiago Cavanillas, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, and Miquel Esteban*

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

The competitive binding of Cd^{2+} and Pb^{2+} by the phytochelatin $(\gamma Glu-Cys)_5-Gly$ (PC_5) has been examined by several analytical techniques. Positive-mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is used to determine the stoichiometries of the complexes, while voltammetric and spectroscopic data are analyzed by multivariate curve resolution with alternating least-squares (MCR-ALS) and some recently developed chemometric tools, which allows one to follow the displacement induced by Cd^{2+} or Pb^{2+} in the binding of Pb^{2+} or Cd^{2+}, respectively, by PC_5, and to obtain a complete overview of the processes involved. Differential pulse polarography (DPP) signals of these systems present, besides overlapping peaks due to free metal ion and metal complexes, interference of mercury anodic signals. Circular dichroism (CD) spectroscopy is a useful complementary technique due to the absence of these types of signals and its selective response to different species. A tentative complexation/electrochemical model is proposed for Cd^{2+} and Pb^{2+} competition toward PC_5 complexation. The formation of the previously unreported ternary $CdPb(PC_5)$ complex was suggested by DPP and CD spectroscopy experiments and confirmed by ESI-MS.

Heavy metal contamination in biological systems is among the critical health and environmental concerns. Plants, algae, and certain fungi have developed defense mechanisms to cope with the occurrence of potentially toxic environmental levels of heavy metals.[1−3] One of the most important involves the intracellular thiol-containing compounds designated as phytochelatins (PC_n; commonly $n = 2-6$). PC_n are small cysteine-rich peptides, containing a primary structure which consists of repeating sequences of the γ-glutamyl−cysteinyl dipeptide and a carboxy-terminal glycine $(\gamma Glu-Cys)_n-Gly$.[1] PC_n are directly synthesized from glutathione (GSH, $\gamma Glu-Cys-Gly$) under the control of the enzyme PC synthase by eukaryotes for various cellular functions, notably protection against oxidative stress, metal detoxification, and homeostasis.[1,2] As with GSH and related peptides, complexation with thiophilic metals takes place through the cysteine thiolate groups, due to their high Cys content. On the basis of these phenomena, the use of plants and associated microbes has received considerable attention as an ecological option to remove/immobilize metals, commonly known as phytoremediation.[3] More recently, this field gained a great interest with the possibility of the use of transgenic plants,[4] although the risks and benefits balance of this strategy are yet to be fully considered.

A wide variety of analytical approaches have been used to characterize and/or probe these systems.[5−10] Electroanalytical techniques have been used for the study of Cd−, Pb−, Zn−, Co−, and Cu−GSH or PC_n complexes.[11−13] Either PC_n or one of its fragments has been integrated into electrochemical systems for the detection of heavy metal ions.[14−17] The use of chemometrics to resolve dynamic multicomponent systems (such as metal-complexation equilibria) by electroanalytical means is recent and still scarce,[18,19] especially in comparison with spectroscopic data. A soft-modeling method, denoted as multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS), has been

* To whom correspondence should be addressed. Phone: (+34) 93 403 91 17. Fax: (+34) 93 402 12 33. E-mail: miquelestebanc@ub.edu.

(1) Cobbett, C. S. *Plant Physiol.* **2000**, *123*, 825–832.
(2) Cunningham, S. D.; Ow, D. W. *Plant Physiol.* **1996**, *110*, 715–719.
(3) Salt, D. E.; Smith, R. D.; Raskin, I. *Annual Rev. Plant Biol.* **1998**, *49*, 643–668.
(4) Wolfenbarger, L. L.; Phifer, P. R. *Science* **2000**, *290*, 2088–2093.
(5) Szpunar, J. *Analyst* **2000**, *125*, 963–988.
(6) Chassaigne, H.; Vacchina, V.; Lobinski, R. *Trends Anal. Chem.* **2000**, *19*, 300–313.
(7) Chen, L.; Guo, Y.; Yanga, L.; Wang, Q. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1403–1408.
(8) Spain, S. M.; Rabenstein, D. L. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 3712–3719.
(9) Ali, E. M.; Zheng, Y.; Yu, H.-H.; Ying, J. Y. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9452–9458.
(10) Shirabe, T.; Ito, K.; Yoshimura, E. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9360–9362.
(11) Scarano, G.; Morelli, E. *Electroanalysis* **1998**, *10*, 39–43.
(12) Dorčák, V.; Šestáková, I. *Bioelectrochem.* **2006**, *68*, 14–21.
(13) Supalkova, V.; Huska, D.; Diopan, V.; Hanustiak, P.; Zitka, O.; Stejskal, K.; Baloun, J.; Pikula, J.; Havel, L.; Zehnalek, J.; Adam, V.; Trnkova, L.; Beklova, M.; Kizek, R. *Sensors* **2007**, *7*, 932–959.
(14) Chow, E.; Hibbert, D. B.; Goodling, J. J. *Analyst* **2005**, *130*, 831–837.
(15) Bontidean, I.; Ahlqvist, J.; Mulchandani, A.; Chen, W.; Bae, W.; Mehra, R. K.; Mortari, A.; Csoregi, E. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 547–553.
(16) Adam, V.; Zehnalek, J.; Petrlova, J.; Potesil, D.; Sures, B.; Trnkova, L.; Jelen, F.; Vitecek, F.; Kizek, R. *Sensors* **2005**, *5*, 75–84.
(17) Wildgoose, G. G.; Leventis, H. C.; Davies, I. J.; Crossley, A.; Lawrence, N. S.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G. *J. Mater. Chem.* **2005**, *15*, 2375–2382.
(18) Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M. In *Comprehensive Chemometrics*; Brown, S.; Tauler, R.; Walczak, R.; Elsevier: Oxford, 2009; Vol. 4, pp 425−458.
(19) Ni, Y.; Kokot, S. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *626*, 130–146.

10.1021/ac1019733 © 2010 American Chemical Society
Published on Web 10/08/2010

developed and widely used with spectroscopic data.[20] Further, MCR-ALS was adapted for its use with voltammetric data[18,19] and satisfactorily applied in a variety of metal/Cys-peptide studies, among them the competitive complexation of Zn and Cd by metallothionein α- and β-domains[21] and metal−PC_3[22] and −PC_4.[23]

In the present paper, for the first time, the competitive binding of two nonessential metals (Cd^{2+} and Pb^{2+}) by PC_5 is examined through the combined use of different analytical techniques and methods. Differential pulse polarography (DPP) and circular dichroism (CD) are used, and their data are analyzed by MCR-ALS and some recently developed chemometrical tools[24] (*shiftfi*t and *pHfit* algorithms) for nonlinear data such as those obtained in electrochemical experiments when pH is progressively changed. Furthermore, positive mode electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is used to determine the stoichiometries of the complexes formed. The use of both electrochemical and spectroscopic techniques is of special interest because each enables a particular insight toward components or processes: the electrochemical technique monitors free and bound metal ions, through their reductions, and the optical one monitors the free and bound phytochelatins through their conformational changes. Finally, examination of the relationships that exist between various metal ions and following displacements induced between metal ions toward PC_5 is helpful, because it allows metal-polluted natural systems, which are typically contaminated by more than one metal, to reproduce.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Instrumentation. The phytochelatin PC_5, $(\gamma Glu-Cys)_5-Gly$, as trifluoroacetate salt, was provided by DiverDrugs S.L. (Barcelona, Spain) with a purity of 98.4%. PC_5 stock solutions (1 mL, 10^{-3} mol L^{-1}) were prepared daily. To ensure homogeneity, solutions were mixed at 1400 rpm for 1 min using Eppendorf Mixmate.

All other reagents were of analytical grade from Merck. Cd^{2+} and Pb^{2+} stock solutions (10^{-2} mol L^{-1}) were prepared by dissolving $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ and $Pb(NO_3)_2$ in water and were standardized complexometrically. BIS-TRIS (2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2′,2″-nitrilotriethanol) was used as pH 6.5 buffer, and KNO_3 was used as a supporting electrolyte at 0.05 mol L^{-1} to ensure ionic strength. All solutions were freshly prepared with buffer deoxygenated by nitrogen.

Voltammetric measurements by differential pulse polarography (DPP) were performed using a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. Working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.9 mm^2 and a drop time of 1s, Ag/AgCl, KCl (3 mol L^{-1}), and glassy carbon, respectively, all of them from Metrohm. Double distilled Hg was used. CD and positive-mode ESI-MS spectra were obtained by means of a Jasco Spectropolarimeter, model J-810, and a Q-TOF Agilent 1100, respectively. pH measurements were made with an Orion SA 720 pH meter. All the experiments were carried out at 20 °C, and purified nitrogen was used for solution deaeration.

Procedures. *Voltammetric Titrations.* Measurements were done at different pH values for fixed metal-to-PC_5 ratios. At the beginning of every experimental run, 20 mL of an equimolar solution containing Pb^{2+} or $Cd^{2+}$and PC_5, as well as 0.1 mol L^{-1} KNO_3, was poured into the cell, and a DPP scan was recorded. Then, KOH tritisol Merck solutions of different concentrations were successively added in order to change steadily the pH of the cell solution inside the range of 2−9. After every addition, pH was measured and a new DPP curve was recorded. For PC_5, similar DPP measurements were performed in the absence of the metal ion, in order to check the respective anodic signals.

Complexometric titrations were performed by DPP at 5×10^{-2} mol L^{-1} BIS-TRIS (pH 6.5) and 5×10^{-2} mol L^{-1} KNO_3. In each case, 20 mL of 10^{-5} mol L^{-1} starting solution were placed in the voltammetric cell. Instrumental parameters for DPP experiments were a voltage step of 5 mV, pulse amplitude of 50 mV, pulse time of 0.05 s, drop time of 1s, and a sweep rate of 50 mV s^{-1}. After deaerating with pure N_2 for 20 min, DP polarograms were recorded. Further, successive additions of 10^{-3} mol L^{-1} Cd^{2+}, Pb^{2+}, or PC_5 solution were made, and polarograms were again recorded. After each addition, solutions were purged with N_2 and mechanically stirred for 1.5 min. Data were corrected for dilution effects.

Circular Dichroism Spectroscopy. Solutions of different Cd^{2+}, Pb^{2+}, and/or PC_5 concentration ratios, in 5×10^{-2} mol L^{-1} BIS-TRIS buffer at pH 6.5 (2 mL), were scanned at room temperature. Data were collected at 0.1 nm intervals with a 100 nm min^{-1} scan speed, 1 nm bandwidth, and 4 s response from 400 to 200 nm; a cylindrical quartz cell of 10 mm lightpath was used. The CD intensities in the far UV regions are expressed as molar residue elliptic ties given in unit of deg cm^2 mol^{-1}.

Electrospray Ionization Mass Spectrometry Experiments. In ESI-MS experiments, direct injection of 50 μL of a sample, in 2×10^{-2} mol L^{-1}ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer (pH 6.5), was carried at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} with a source temperature of 150 °C and desolvation temperature of 300 °C. A 1:9 acetonitrile (HPLC grade) and 5×10^{-3} mol L^{-1} ammonium acetate mixture was adjusted at pH 6.5 and used as solvent. The applied capillary voltage was fixed at 4 kV, and the effect of cone potential was studied at three different values (150, 250, 350 V). The mass spectra were collected throughout a m/z range from 200 to 3000. The instrumental control, mass spectra deconvolution, and analysis were made with MassHunter Workstation Software (B.02.00).

Data Treatment. Voltammogramms were smoothed, baseline corrected, and converted into data matrixes using homemade programs implemented in MATLAB.[25] MCR-ALS analysis of data was carried out through several programs also implemented in MATLAB (some of them available at http://www.ub.edu/mcr/ndownload.htm), following the general methodology described in previous papers.[21−23] The method based on algorithm *pHfit*

(20) Tauler, R.; Kowalski, B.; Fleming, S. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 2040–2047.
(21) López, M. J.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Tauler, R.; Esteban, M. *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 5609–5616.
(22) Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 778–786.
(23) Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 2860–2866.
(24) Díaz-Cruz, J. M.; Sanchis, J.; Chekmeneva, E.; Ariño, C.; Esteban, M. *Analyst* **2010**, *135*, 1653–1662.
(25) *Matlab version 7.3.0.267*; Mathworks Inc.: Natick, MA, 2006.

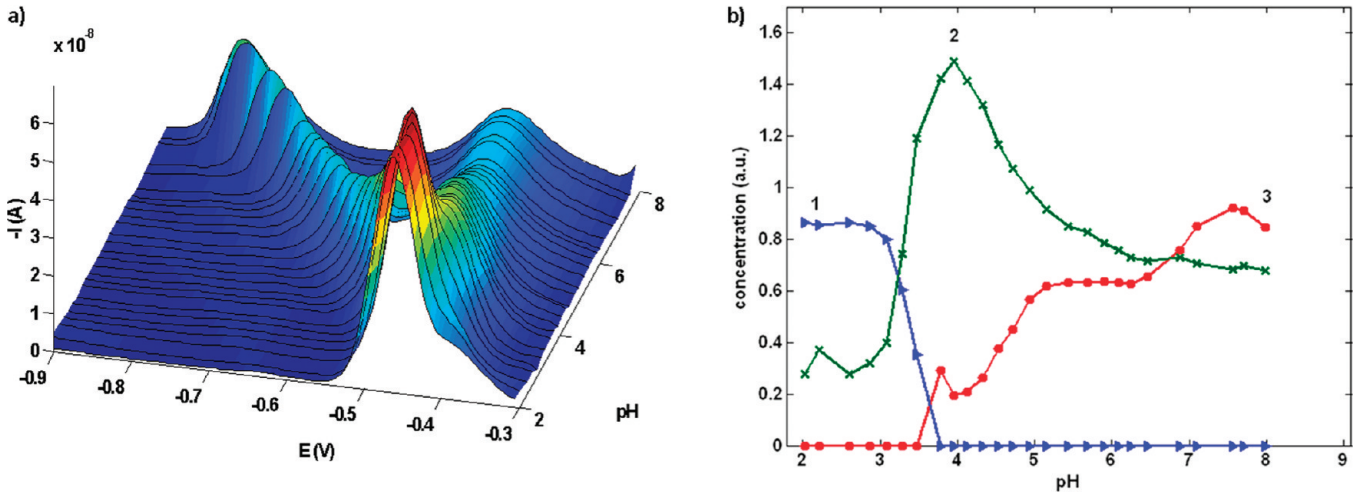


Figure 1. Experimental data matrix (current vs potential vs pH) obtained in the DPP pH titrations of the equimolar $Pb^{2+}-PC_5$ system in 0.05 mol L^{-1} KNO_3 (a). Concentration profiles obtained after the *pHfit* method with a lof of 14.1% (b). Components: 1, reduction of free Pb^{2+}; 2, anodic signal of $Pb-PC_5$ complex; 3, reduction of $Pb-PC_5$ complex.

performs the least-squares fitting of peak potentials vs pH data sets to parametric linear and sigmoid functions through decomposition of the data matrix into both a concentration profile matrix and a unit signal matrix, in a similar way as ALS.[24] Algorithm *shiftfit* is used for the correction of the progressive potential shift of some voltammetric signals that decrease the linearity of the data.[26]

RESULTS AND DISCUSSION

Voltammetric pH Titrations. Metal ion/thiol-peptide complexation data obtained by voltammetry typically show many overlapping and moving peaks, which greatly hinder their treatment and further interpretation. However, voltammetric pH titrations contain stoichiometric information of the complexes, especially when H^+-ions are involved in their electrochemical reductions. In this case, pH variation causes a progressive peak potential shift of the signals. Therefore, a study of the evolution of signals vs pH variation is crucial. Furthermore, these experiments allow us to determine the optimal pH range to better differentiate the metal complexes and minimize the overlapping of signals.

Behavior of PC_5 along pH Range. The anodic signal of PC_5 moves to more negative values, and the peaks become wider (especially at pH > 6) as pH increases (see Figure S-1a in Supporting Information). This anodic signal is due to the formation of mercury thiolates. Data can be analyzed visually or by the *pHfit* algorithm. Current has two relative maxima at pH 5 and 8, while peak potential has a linear dependence on pH (see Figures S-1b, S2, and S6 in Supporting Information, obtained from *pHfit* with a lack of fit (lof) of 17.58%). This value is relatively high because *pHfit* does not fit the widths of peaks, which are supposed to be constant. However, the widths of the PC_5 peaks are increasing from 66 to 140 mV during the pH titration. The PC_5 movement was adjusted to a straight line with a slope of 0.062 (Figure S-6 in Supporting Information).

Behavior of the Equimolar $Pb^{2+}-PC_5$ System along pH. The signal for the reduction of free Pb^{2+} (component 1, at −0.45 V) is dominant until pH 4 (Figure 1a). This peak shifts to more negative potentials as pH increases, which implies the formation of some $Pb-PC_5$ complex (component 3). Simultaneously, an anodic signal (component 2) of the $Pb-PC_5$ complex (due to some complex with Hg) appears at the same potential of free Pb^{2+}.

The application of *pHfit* allows us a satisfactory adjustment of the movement of the $Pb-PC_5$ complex signal (component 3) to a straight line with a slope of 0.073 V (Figure S-6, Supporting Information), with a lof of 14.1%. The concentration profiles show that Pb^{2+} (component 1) is complexed by PC_5 at pH > 3 (Figure 1b). The sharp disappearance of component 1 inside the pH range of 3 to 4 confirms the strong complexing power of PC_5 even when all the thiol and amino groups are protonated. Pb^{2+} ions are weakly bound to PC_5, through the carboxylate groups, which are the first to be deprotonated. This statement is confirmed by the appearance of component 3, which predominates from pH 4 and reaches a plateau at pH ca. 6. This suggests that when the first thiol groups start to be deprotonated at pH close to 6, Pb^{2+} ions start to be weakly bound to thiol groups. At pH not much higher than 6, these ions are strongly bound. It must be also remarked that in the concentration profile of component 3 the inflection points of the two rising zones, which are separated by a plateau, are coincident with the p*K*a of the involved functional groups. Similar tendencies were observed for the equimolar $Cd^{2+}-PC_5$ system (more details in section S-1.3, Supporting Information).

Conditional stability constants of the metal complexes were roughly estimated from the Nernst equation (further detail in Supporting Information, S5). The value for $Pb-PC_5$ complex (log $K' = 8.7$) is higher than the one of $Cd-PC_5$ (log $K' = 6.1$). This is intriguing because it suggests that displacements of Pb^{2+} bound to PC_5, by Cd^{2+}, should not occur. This is largely contradicted by the results exposed in the following sections. Such conditional stability constants are, however, an overestimation, since the used parameter (ΔE, further details in Data Treatment, Supporting Information) has not only a thermodynamic component but also a kinetic contribution of the usually irreversible metal complex reduction. It could happen that the

(26) Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. *Analyst* **2008**, *133*, 470–477.

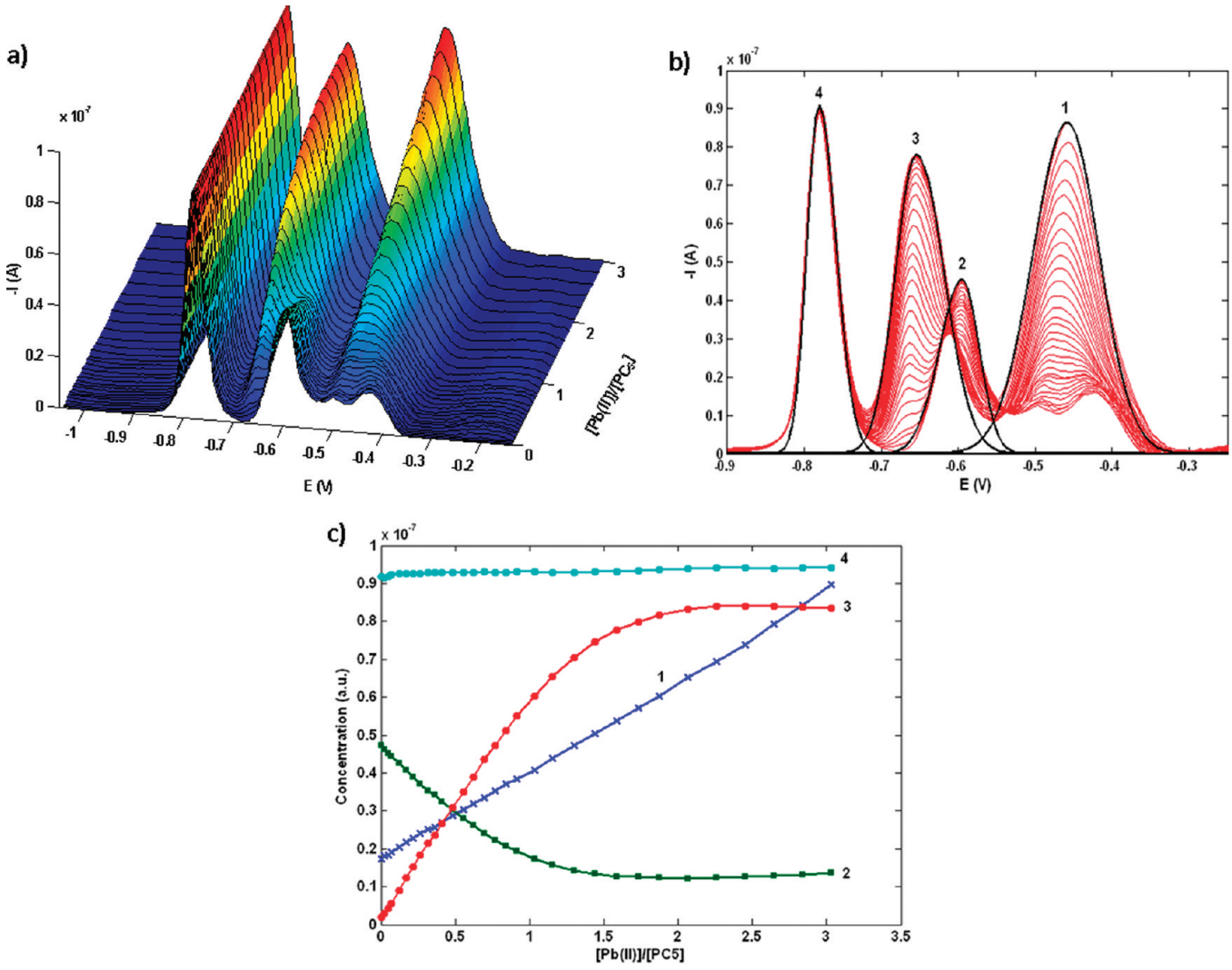


Figure 2. Experimental data matrix (current vs potential vs concentration ratio) obtained in the DPP titration of a 3:1 PC_5−Cd^{2+} solution with Pb^{2+} in BIS-TRIS buffer at pH 6.5 (a). Current vs potential curves for the same experiment plus the initial estimate of voltammograms for ALS optimization (in bold) (b). Concentration profiles obtained after the MCR-ALS method with the following constraints: non-negativity for concentrations and voltammograms and peak-shape and unimodality constraints for components 3 and 4 (lof = 10.68%) (c). Components: 1, anodic signals and Pb^{2+}; 2, anodic signal of PC_5; 3, Pb−PC_5 complexes; 4, $Cd_2(PC_5)$ complex.

kinetic contribution of Pb complexes is much higher than that of Cd complexes, thus enhancing the estimation of log *K′* of Pb complexes to surpass the expected higher value for the case of Cd.

Voltammetric Experiments of Competitive Binding. Voltammetric data are analyzed by MCR-ALS and, when necessary, with the *shift* subroutine (an extended version of *pHfit* for titrations where variables other than pH are changed) to correct peak movements along the experiment. From this analysis, information about species present in solution and their evolution along the titration are obtained.

Due to the nature of electrochemical measurements, it is important to remark that the concept of "component" in MCR-ALS refers to the signal from an electrochemical process and not to a chemical species, as in spectroscopic data.[21–24] For instance, in the complexes containing two different electroactive sites (e.g., two metal ions reducing at different potentials), two components (i.e., electrochemical processes) may be associated with a unique chemical species. These considerations play a key role in further interpretation of MCR-ALS results. Component assignments are maintained throughout this paper, and four different types of experiments are conducted as described below.

Addition of Pb^{2+} to a 3:1 PC_5−Cd^{2+} Solution. The voltammogram of a 3:1 PC_5−Cd^{2+} solution shows the signals of the Cd−PC_5 complex (at −0.78 V), free PC_5 (at −0.60 V), and a global signal (at $-0.40 < E < 0.51$ V) due to the anodic process of Hg in the presence of PC_5 complexes (first voltammogram in Figure 2a). When Pb^{2+} is added, it complexes PC_5 producing the peak at −0.65 V while the most anodic signal increases due to the overlapping of the anodic signals of Hg in the presence of both metal complexes. Free Pb^{2+} reduction signal is highly affected by these interferences.

Figure 2c shows the concentration profiles obtained by MCR-ALS, with a lof of 10.68%, using the initial estimates of unitary voltammograms shown in Figure 2b (in bold). These results reveal that Pb^{2+} does not displace Cd^{2+} from their PC_5 complexes. This is supported by (i) component 4 (reduction of Cd^{2+} in Cd−PC_5 complex) does not shift its potential and (ii) its concentration profile remains constant during the experiment. Furthermore, the reduction of Pb−PC_5 complex(es) (compo-

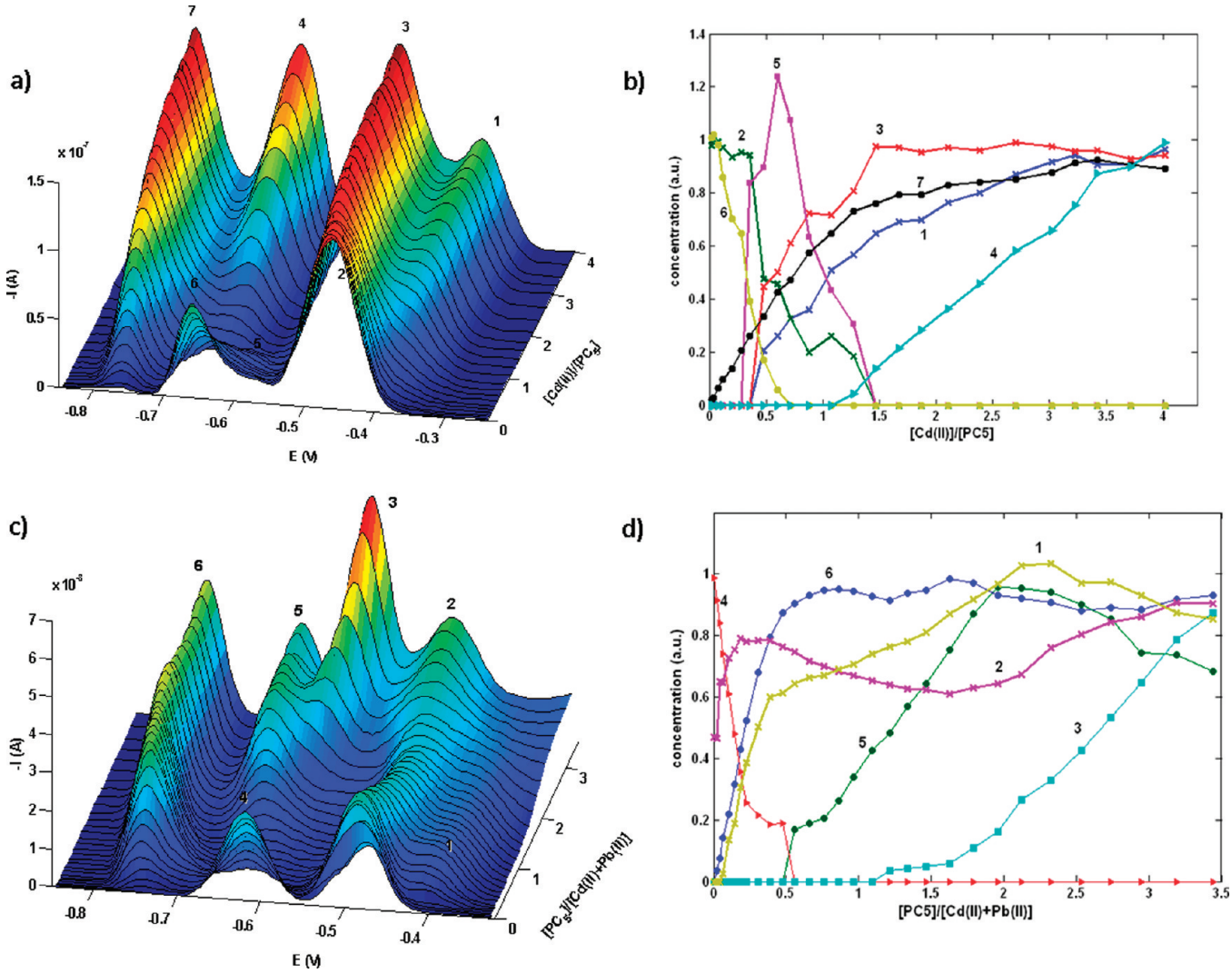


Figure 3. DPP curves for the titration of a 2:1 $Pb^{2+}-PC_5$ solution with Cd^{2+} in BIS-TRIS buffer at pH 6.5 (a). Concentration profiles (b). Components: 1, 2, and 3, anodic signals and free Pb^{2+}; 4, free Cd^{2+}; 5, $Pb-Cd-PC_5$; 6, Pb_2-PC_5; 7, $Cd(PC_5)$ complexes. DPP curves for the titration of a 1:1 $Pb^{2+}-Cd^{2+}$ with PC_5 in BIS-TRIS buffer at pH 6.5 (c). Concentration profiles (d). Components: 1 and 2, anodic signals and free Pb^{2+}; 3, PC_5; 4, free Cd^{2+}; 5, $Pb(PC_5)$ complexes; 6, $Cd(PC_5)$ complexes.

nent 3) increases until a 2:1 $[Pb^{2+}]-[PC_5]$ ratio. The signal due to free PC_5 (component 2) decreases until ca. a 1:1 $[Pb^{2+}]-[PC_5]$ ratio, thus confirming the formation of Pb complexes. In the zone affected by anodic signals, the initial signals related with Hg oxidation in the presence of Cd complexes increase due to the formation of Pb^{2+} complexes and at the end point of the titration, due to the appearance of free Pb^{2+} (component 1).

Additions of Cd^{2+} to a 2:1 $Pb^{2+}-PC_5$ Solution. Figure 3a shows the progressive decreasing of the peak due to the $Pb-PC_5$ complex (at −0.66 V) and increasing of that corresponding to the $Cd-PC_5$ one (at −0.76 V), which shifts to more negative potentials. The reduction of the free Pb^{2+} (at −0.46 V) liberated from its complex overlaps with the signals due to the anodic processes of Hg in the presence of metal$-PC_5$ complexes. At the end of the titration, the free Cd^{2+} reduction peak appears.

The singular values decomposition (SVD, not shown) of the data set fom Figure 3a shows that seven mathematical components are necessary for satisfactory explanation of data variation. The *shift* algorithm analysis yields the concentration profiles (Figure 3b), as well as the reproduced, corrected, and error matrixes shown in the Supporting Information (Figure S-7), with a lof of 8.02%, which is quite satisfactory. The results reveal that the additions of Cd^{2+} release Pb^{2+} from their PC_5 complexes. The concentration profile of the $Pb-PC_5$ complex (component 6) decreases until a 1:2 $Cd^{2+}-PC_5$ ratio. Before that ratio, component 3 (reduction of Pb^{2+}) appears and then stabilizes at a ratio close to 1. However, at these intermediate ratios, when Pb complex disappears and free Pb^{2+} is released, a new component (number 5) appears at peak potential slightly more positive than that of Pb complex. This suggests the ternary complex formation. First, one Cd^{2+} incorporates the complex displacing one Pb^{2+} and forming a mixed metal complex. Then, at higher excess of Cd^{2+} in solution, a second Cd^{2+} would displace the second Pb^{2+} from the complex. The peak of Cd^{2+} complex (component 7) was corrected with respect to the peak movement in the potential axis, and it shows how this component increases until the 1.5 $Cd-PC_5$ ratio, confirming that Cd^{2+} displaces Pb^{2+} from their complexes. Free Pb^{2+} reduction (component 3) is affected by the anodic process

(components 1 and 2), and it exhibits an increase throughout Cd^{2+} additions. Free Cd^{2+} reduction (component 4) appears at ratios above 1.5.

Additions of PC_5 to an Equimolar Pb^{2+}−Cd^{2+} Solution. Figure 3c shows that the signal of free Cd^{2+} decreases more drastically than that of Pb^{2+} with PC_5 additions and that the signal of Cd−PC_5 complex appears (at −0.75 V) from the beginning. Further, PC_5 additions produce a peak due to Pb−PC_5 complex (at −0.64 V) and, finally, the free PC_5 peak (at −0.56 V). The peak of free $Pb^{2+}$is highly affected by the anodic signal of Hg in the presence of PC_5 with both metals in solution.

In the concentration profiles obtained by the *shift* algorithm (with a lof of 11.93%), free Cd^{2+} (component 4) disappears at the 0.5:0.5:0.5 PC_5−Cd^{2+}−Pb^{2+} ratio (Figure 3d). Simultaneously, the Cd−PC_5 complex appears (component 6), and it increases until the same ratio is reached. In order to obtain the concentration profiles, this component was corrected with respect to its movement in potential axis. As a consequence, its profile does not represent any particular complex but the global reduction of Cd^{2+} bound to PC_5 in different ways. The Pb−PC_5 complex (component 5) appears at the same PC_5−Cd^{2+}−Pb^{2+} ratio and increases until a PC_5 concentration of twice the total metal one is reached. The free PC_5 signal (component 3) was corrected for the movement in the potential axis, and it appears at a ratio of 1, suggesting the formation of 1:1 Cd−PC_5 and Pb−PC_5 complexes. Further, PC_5 additions yields free PC_5 excess in solution. Although the lack of fit is quite satisfactory (lof = 11.93%), some ambiguities in the resolution of some component must be noted. Thus, the intercept in *x*-axis of PC_5 profile is between 1 and 1.5, when Pb−PC_5 signal (component 5) is still increasing. This seems to suggest an additional binding of PC_5 which is difficult to justify. These results reveal that PC_5 has more affinity for Cd^{2+} because, since the first addition, PC_5 preferably forms the 1:1 Cd−PC_5 complex and only when all Cd^{2+} is complexed do the 1:1 Pb−PC_5 complexes start to appear.

Circular Dichroism Spectroscopy. The resolution of some components profile is affected by the overlapping of signals, which introduces some uncertainties in the interpretation of the MCR-ALS results. For this reason, some titrations were reproduced by CD spectroscopy. This technique has been widely used in metal−PC_n studies,[26–28] and also has demonstrated great usefulness, when it is necessary, to complement and clarify results obtained by electrochemical means.[26] Moreover, this technique can be applied to relatively diluted solutions like those studied in voltammetry with the advantage that spectroscopic measurements are based on totally different principles (absence of voltammetric anodic signals).

Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+}−PC_5 Solution. This experiment has been performed in two parts: (i) an initial titration of PC_5 with Pb^{2+} until a 2:1 Pb^{2+}−PC_5 ratio (which is analyzed in section S-3 in the Supporting Information) and then (ii) a titration of the previous final solution with Cd^{2+} (analogously to the experiment in Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+}−PC_5 Solution). The

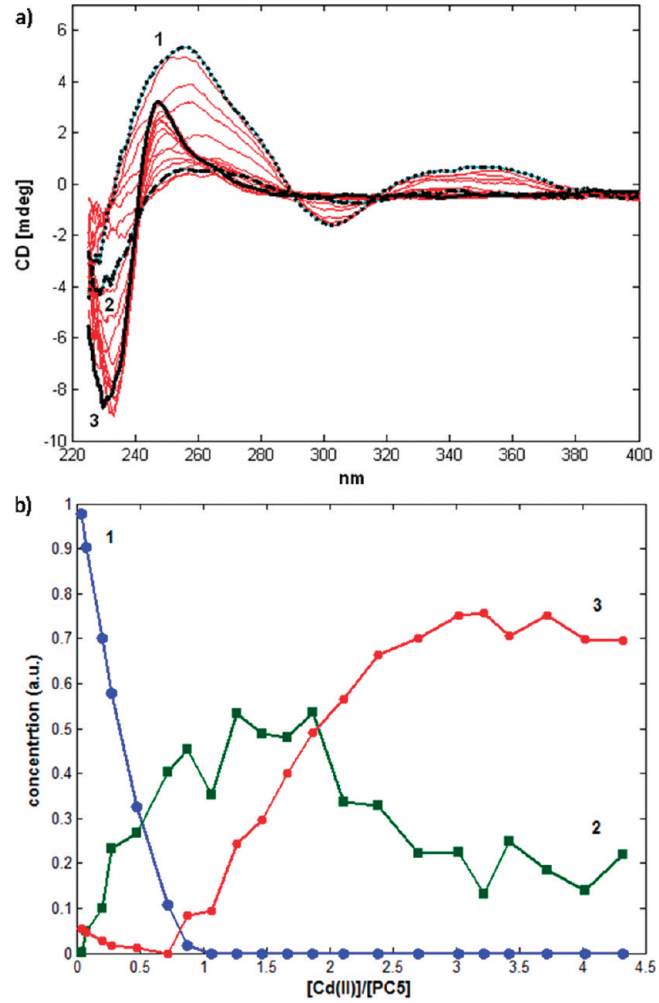


Figure 4. Circular dichroism spectra measured during the titration of a 2:1 Pb^{2+}−PC_5 solution (10^{-5} mol L^{-1}) with Cd^{2+}, at pH 6.5 in 5 × 10^{-3} mol L^{-1} BIS-TRIS-CH_3COOH buffer and pure spectra used for component estimation (bold lines) (a). Concentration profiles obtained in the MCR-ALS analysis of the spectroscopic matrix (b). Components are as follows: 1, $Pb_2(PC_5)$; 2, $CdPb(PC_5)$; 3, $Cd_2(PC_5)$.

first spectrum in Figure 4a shows that the initial Pb complex (spectrum 1) has characteristic zones: an intense positive band at 240−280 nm, a weaker positive band at 320−370 nm, and a negative band at 280−320 nm.

Cd^{2+} additions to the Pb−PC_5 solution produce a decrease of Pb complex ($Pb_2(PC_5)$). This can be easily visualized by the disappearance of its "characteristic" signals (spectrum 2). At the end of the titration, only the signals of Cd complexes (at positive 240−260 nm and negative 220−240 nm) are present (spectrum 3). SVD of the data set shows that three components are necessary for satisfactory analysis. In order to obtain initial unitary spectra for ALS iterative optimization, SIMPLISMA algorithm[29] was used. When MCR-ALS is applied to the data matrix of Figure 4a, this is decomposed into the concentration profiles (Figure 4b) and unitary normalized CD signals, which are very similar to those initially used for ALS optimization, with a lof of 9.99%. These results reveal that, within the first additions, Cd^{2+} displaces Pb^{2+} and a signal of a possible ternary complex

(27) Mehra, R. K.; Kodati, V. R.; Abdullah, R. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *215*, 730–736.
(28) Mehra, R. K.; Miclat, J.; Kodati, V. R.; Abdullah, R.; Hunter, T. C.; Mulchandani, P. *Biochem. J.* **1996**, *314*, 73–82.
(29) Widing, W.; Guilment, J. *Anal. Chem.* **1991**, *63*, 1425–1432.

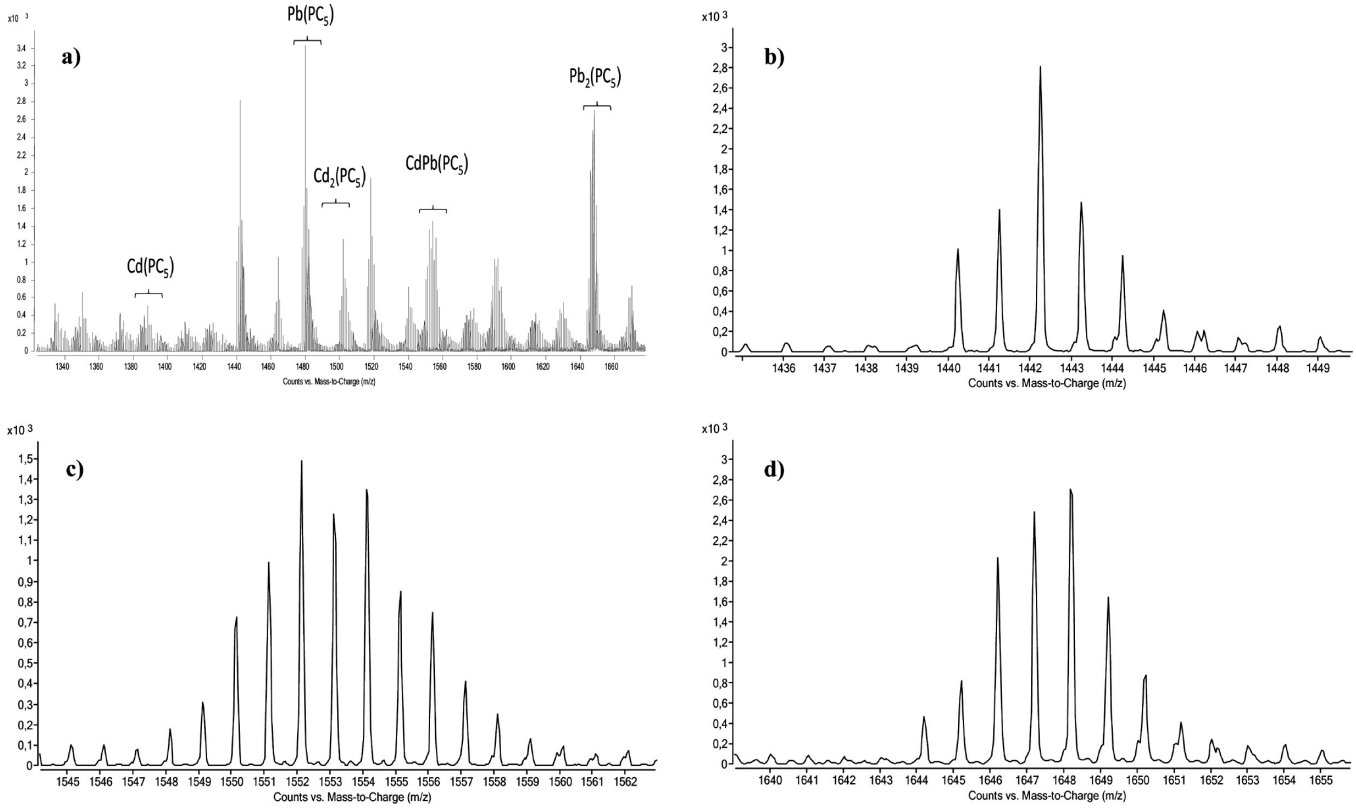


Figure 5. Positive mode ESI-MS spectra for (a) sample S3 (3:1:1 $[PC_5]-[Pb^{2+}]-[Cd^{2+}]$). Details for the patterns obtained for (b) $Pb(PC_5)$ complex ($[PbPC_5 - H]^+$ at 1442 *m*/*z*, sample S5 in Table S-1, Supporting Information); (c) $PbCd(PC_5)$ complex ($[CdPbPC_5 - 4H]^+$ at 1552 *m*/*z*, sample S2 in Table S-1, Supporting Information); (d) $Pb_2(PC_5)$ complex ($[Pb_2PC_5 - 3H]^+$ at 1648 *m*/*z*, sample S5 in Table S-1, Supporting Information). Direct injection of 50 μL, in 2×10^{-2} mol L^{-1} CH_3COONH_4/NH_4OH buffer (pH 6.5), at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} with an applied cone potential of 350 V.

(component 2) is detected. The disappearance of component 1 ($Pb_2(PC_5)$) and appearance of component 3 ($Cd_2(PC_5)$) takes place at $Cd-PC_5$ ratios close to 1, as the maximum of component 2 (mixed complex). From then on, a signal of a second Cd^{2+} complex (component 3, Cd_2-PC_5) appears, and it increases until ratio 2. It cannot be a ternary complex because of the absence of spectroscopic activity in the near-UV region. This is consistent with the electrochemical observations.

Additions of Pb^{2+} to a 3:1 $Cd^{2+}-PC_5$ Solution. No qualitative changes were observed and no evidence of $Pb(PC_5)$ complexes were detected (Figure S-10, in Supporting Information). This confirms that $Cd(PC_5)$ complexes are not affected by Pb^{2+} additions and that Cd^{2+} ion has more affinity for PC_5 than Pb^{2+}.

Positive Mode ESI-MS. ESI-MS experiments of $Cd-PC_5$ complexes have been previously analyzed.[30] However, here, the competitive binding is studied by analyzing samples obtained from different experimental designs. The influence of optimal cone voltage was studied in order to obtain the optimized signal. Isotopic distribution was reproducible in all applied potentials, although signals at 350 V of the skimmer cone potential allowed better results. Table S1 (Supporting Information) summarizes the different studied samples, and Figure 5 shows the evolution of signal intensities. Furthermore, in the Supporting Information (Figure S-12), some representative spectra are shown.

The first set of experiments (Figure 5a) consisted of reproducing the voltammetric titration in section Additions of PC_5 to an Equimolar $Pb^{2+}-Cd^{2+}$ Solution by adding different PC_5 concentrations to an equimolar $Cd^{2+}-Pb^{2+}$ solution. In the first sample (sample S1 in Table S-1, Supporting Information; $Pb-Cd-PC_5$, 1:1:1), only the signal of Cd^{2+}complexes appears, $[CdPC_5 - H]^+$ (ML, at 1348 *m*/*z*) and $[Cd_2PC_5 - 3H]^+$ (M_2L at 1458 *m*/*z*) both with the same intensity of signal. Likewise, the ternary complex $[CdPbPC_5 - 3H]^+$ at 1552 *m*/*z* is detected (previously unreported, shown in Figure S-11, Supporting Information), but there is an absence of signals related with lead complexes.

As PC_5 concentration increases (samples S2 and S3 in Table S-1, Supporting Information; 1:1:2 and 1:1:3, respectively), $Pb(PC_5)$ complexes appear and become predominant: $[PbPC_5 - H]^+$ (ML at 1442 *m*/*z*) and $[Pb_2PC_5 - 3H]^+$ (M_2L at 1648,214 *m*/*z*). This confirms the voltammetric analysis, in which, when metal and PC_5 are at the same relation, the PC_5 is complexed first with Cd^{2+} and then with Pb^{2+}, and the different stoichiometries are ML and M_2L. However, this ternary complex is not detected by voltammetry. In this series, PC_5 signals were omitted due to their higher intensities in comparison with the rest of the peaks.

The second set of experiments (Figure 5b) consisted of the addition of different Cd^{2+} concentrations to a 2:1 $[Pb^{2+}]-[PC_5]$ solution, a replicate of the voltammetric titration in section

(30) Yen, T.-W.; Villa, J. V.; DeWitt, J. G. *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 930–941.

Additions of Cd^{2+} to a 2:1 $Pb^{2+}-PC_5$ Solution. In the 2:1 relation within Cd^{2+}, the signals of free PC_5 and the Pb complexes $[PbPC_5-H]^+$ and $[Pb_2PC_5 - 3H]^+$appear, (ML at 1442 *m/z*) and (M_2L, 1648 *m/z*). In the first addition of Cd^{2+}, the $Cd-PC_5$ complexes are detected (ML at 1348 *m/z* and M_2L at 1458 *m/z*) as well as the ternary complex signals $[CdPbPC_5 - 4H]^+$ at 1552 *m/z*. The intensity of Pb complexes decreases. In the second solution, at 1:1:2 ratio, the Cd_2-PC_5 complex is detected, Pb_2-PC_5 disappears, the signal of $Pb-PC_5$ complex increases, and the ternary complex signal remains constant.

In summary, ESI-MS confirmed general observations obtained in voltammetric analysis. Upon PC_5 addition, this peptide has more affinity toward Cd^{2+} and at first forms the $Cd-PC_5$ complexes and, when in excess, the $Pb-PC_5$ complexes. The addition of Cd^{2+}displaces Pb^{2+} from his complexes, to form the Cd^{2+} complexes. Furthermore, it is remarkable that there is an equilibrium of $Cd-PC_5$ complexes with Pb^{2+} to form the previously unreported ternary complex ($Pb-PC_5-Cd$).

CONCLUSIONS

The proposed methodology, i.e., a combination of chemometrical analysis (MCR-ALS, *shift*, *pHfit*) of voltammetric and spectroscopic measurements complemented by ESI-MS results, has shown a great ability to extract valuable information from the $Cd^{2+}-Pb^{2+}-PC_5$ system, especially because of the contrast of very different experimental techniques which provide complementary points of view. The excellent results suggest that similar strategies could be successfully applied to many involved bioinorganic systems whose low concentration levels prevent the use of conventional techniques of structural determination.

ACKNOWLEDGMENT

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ2009-09471). R.G. and S.C. thank MICINN for their Ph.D. Grants (BES-2007-15385 and BES2010-032352, respectively). The authors are also grateful to A. Alberich for his assistance in initial CD experiments.

SUPPORTING INFORMATION AVAILABLE

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

Received for review July 26, 2010. Accepted September 23, 2010.

AC1019733

SUPPORTING INFORMATION

Circular Dichroism and Voltammetry , assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC_5

Rui Gusmão, Santiago Cavanillas, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz and Miquel Esteban*

Departament de Química Analítica. Universitat de Barcelona

Martí i Franquès 1 - 11, E - 08028 - Barcelona (Spain)

Phone: (+34) 93 402 15 45. Fax: (+34) 93 402 12 33. E-mail: miquelestebanc@ub.edu

*to whom correspondence should be addressed

Table of Contents

S-1 Voltammetric pH Titrations

S-1.1 Behavior of PC_5 along pH range

S-1.2 Behaviour of the equimolar Pb^{2+} - PC_5 system along pH

S-2 Voltammetric experiments of competitive binding

S-2.2 Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+} : PC_5 solution

S-2.3 Additions of PC_5 to an equimolar Pb^{2+}: Cd^{2+} solution

S-3 Circular Dichroism Spectroscopy

S-3.1 Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+}:PC_5 solution

S-3.2 Additions of Pb^{2+} to a 3:1 Cd^{2+}:PC_5 solution

S-4 Positive Mode ESI-MS

S-5 Data Treatment

S-1 Voltammetric pH Titrations

S-1.1 Behavior of PC_5 along pH range. Besides the concentration profiles, the application of *pHfit* program to the experimental data matrix (Fig. S1-a) yields a reproduced matrix (that has to be as similar as possible to the experimental one), an error matrix (the difference between the reproduced and experimental ones, which is used to compute the lack of fit, lof) and a corrected matrix (where the position of every signal is shifted to the reference potential and can be used in linear methods like MCR-ALS). Figure S-2 summarizes this additional information obtained in the analysis of PC_5.

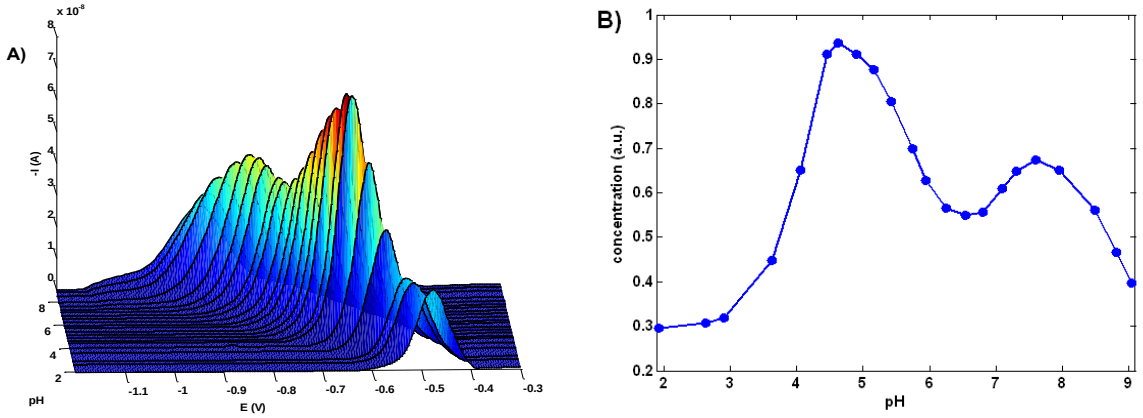


Figure S-1. a) Experimental data matrix (currents *vs.* potential *vs.* pH) obtained in the DPP pH-titrations of PC_5 in 0.05 mol L^{-1} KNO_3 .b) Concentration profiles obtained by the application of *pHfit* with a lof of 17.58%.

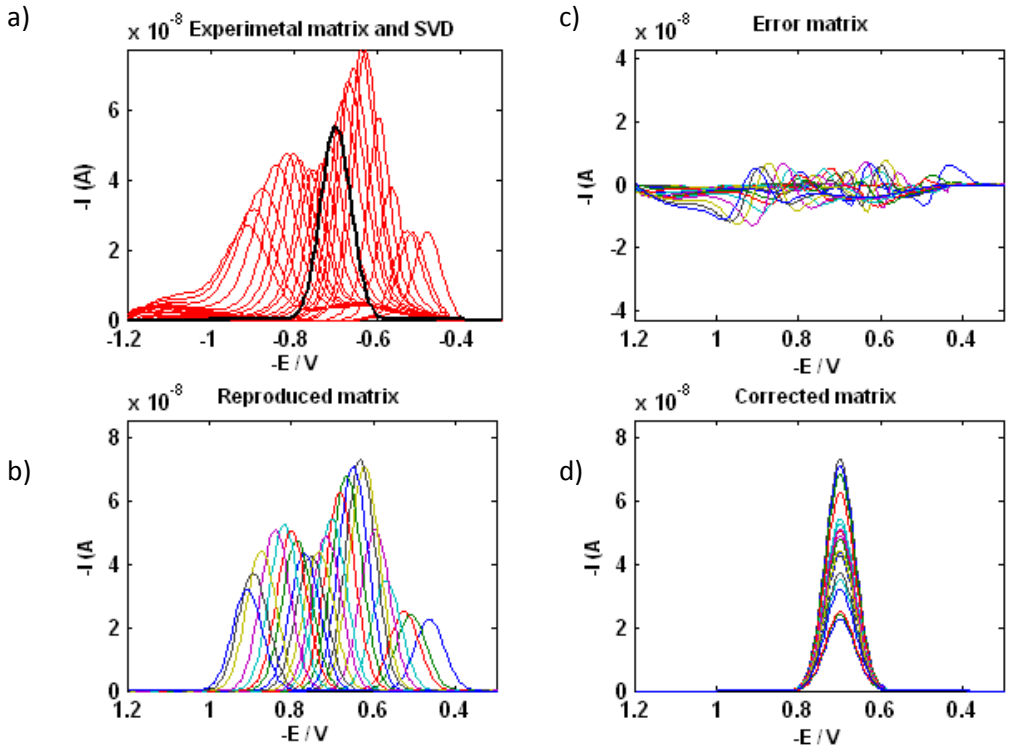


Figure S-2. a) Experimental voltammograms obtained at different pH with the initial estimation of component (thick line). The application of *pHfit* program yielded the reproduced data matrix (b), reproduced matrix (c) error matrix (d) and corrected matrix. PC_5 system (10^{-5} mol L^{-1}) with a 0.05 mol L^{-1} KNO_3 in the absence of metal ion.

S-1.2 Behaviour of the equimolar Pb^{2+}- PC_5 system along pH. For comparison purposes, Figure S-3 shows the same kind of information as in Figure S-2, but now in the presence of Pb^{2+}.

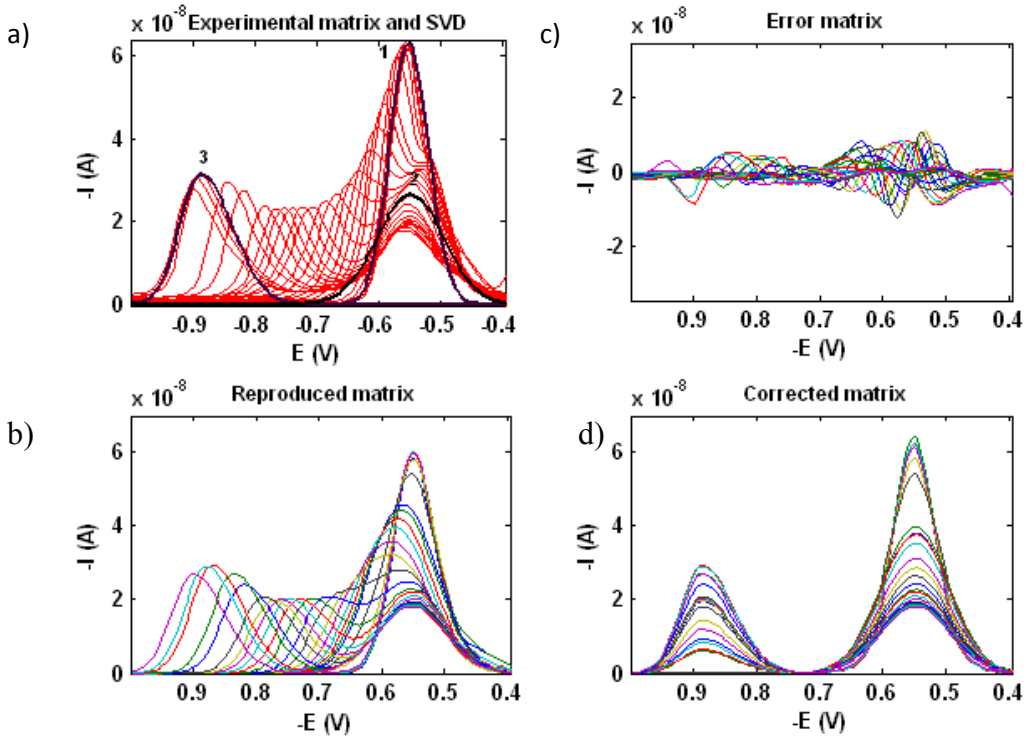


Figure S-3. a) Experimental voltammograms obtained at different pH with the initial estimation of component (thick lines): (1- free Pb^{2+}; 1- anodic signal of Pb-PC_5 complex; 3- Pb-PC_5). The application of *pHfit* program yielded the reproduced data matrix (b), reproduced matrix (c) error matrix (d) and corrected matrix. Equimolar Pb^{2+} - PC_5 system with in 0.05 mol L^{-1} KNO_3.

S-1.3 Behaviour of the equimolar Cd^{2+}- PC_5 system along pH. Figure S-2A shows the evolution of the DPP curves for an equimolar Cd-PC_5 solution when pH increases. Initially, two peaks are observed, which are due to the anodic oxidation of Hg in the presence of PC_5 and to the reduction of free Cd^{2+} (components 1 and 3, respectively). At higher pH, when Cd-PC_5 complexation takes place, there is a signal shift at slightly more negative potentials than that of Cd^{2+}. Parallel to this, another peak appears at more positive potentials (E_p=-0.40V), which persists throughout the titration and whose signal moves towards more negative potential. This signal, denoted as component 2, is due to the-anodic oxidation of Hg with Cd-PC_5 complex.

The application of *pHfit* allows a satisfactory resolution of the system with a lof of 15.9%. The movement of Cd-PC_5 complex (component 4) was adjusted to a straight line with a slope of 0.062 V (see curve Cd-PC5 in Figure S-3). The concentration profile (Figure S-2B) shows that, at pH values close to 4, PC_5 is complexed by Cd^{2+}, because before this pH is reached the signal of free Cd^{2+} has no movement.

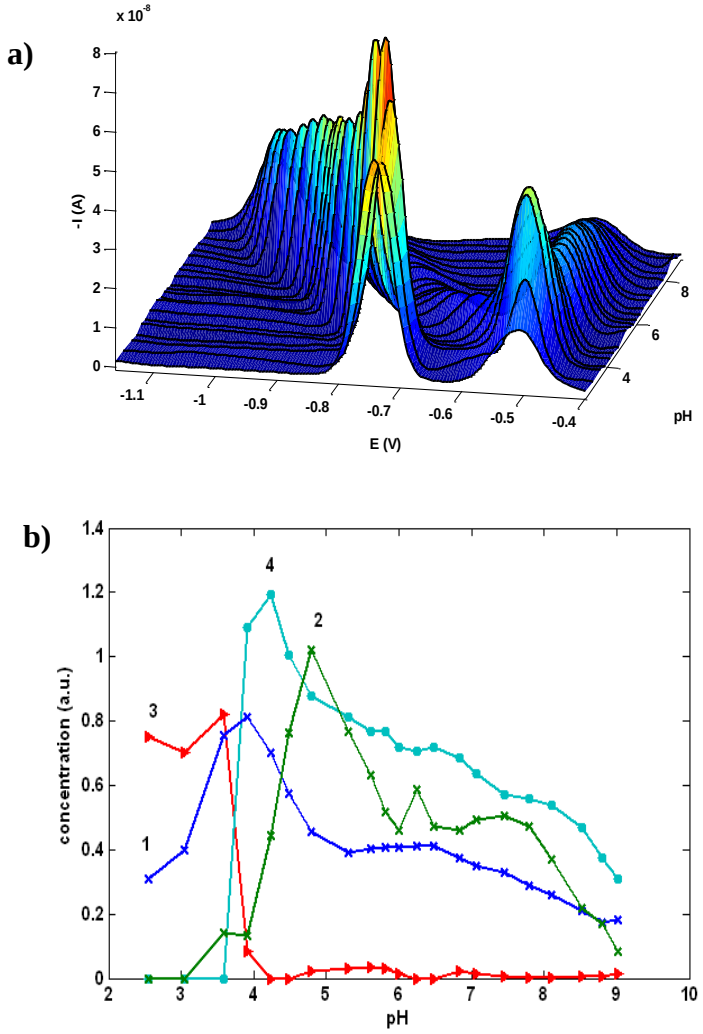


Figure S-4. Experimental data matrix (current *vs.* potential *vs.* pH) obtained in the DPP pH- titrations of an equimolar Cd^{2+} - PC_5 solution in 0.05 mol L^{-1} (KNO_3) (a). Concentration profiles obtained after *pHfit* analysis with a lof of 15.9 % (b). Components are: 1 and 2- anodic signals of Pb-PC_5 complex and free PC_5, respectively; 3- free Cd^{2+}; 4 - Cd-PC_5.complex.

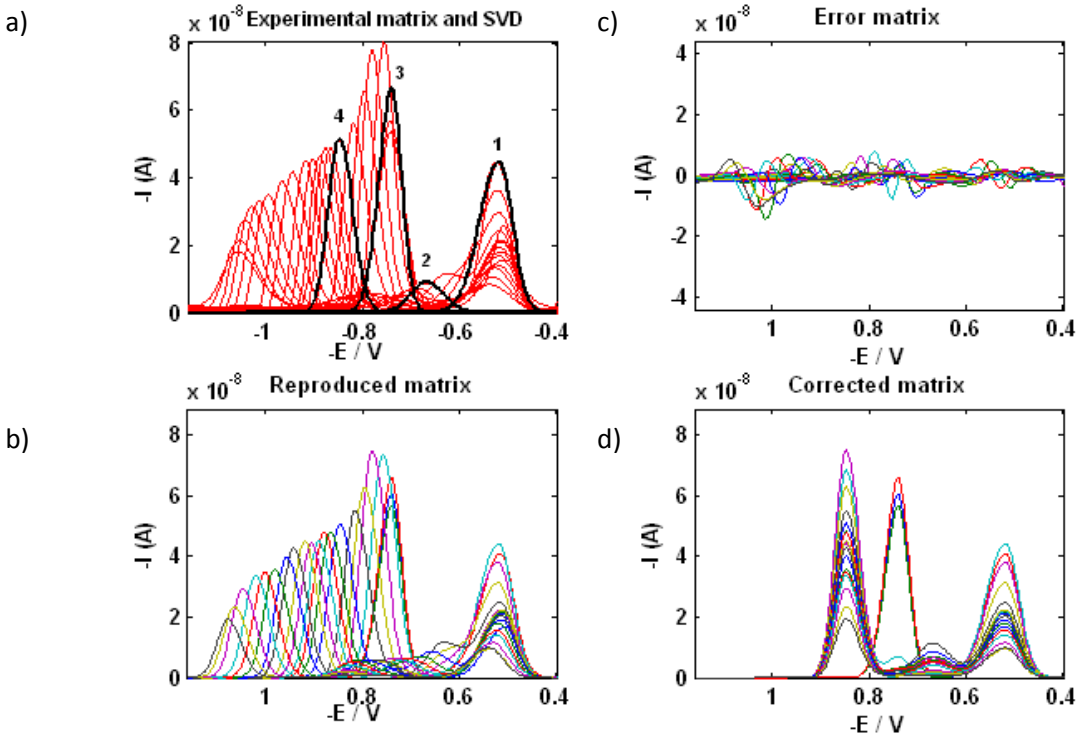


Figure S-5. a) Experimental voltammograms obtained at different pH with the initial estimation of component (thick lines): (1,2-anodic signals of Cd-PC_5 complex and PC_5 free; 3 free Cd^{2+}; 4- Cd-PC_5.). The application of *pHfit* program yielded the reproduced data matrix (b), reproduced matrix (c) error matrix (d) and corrected matrix. Equimolar Cd^{2+} - PC_5 system with in 0.05 mol L^{-1} KNO_3.

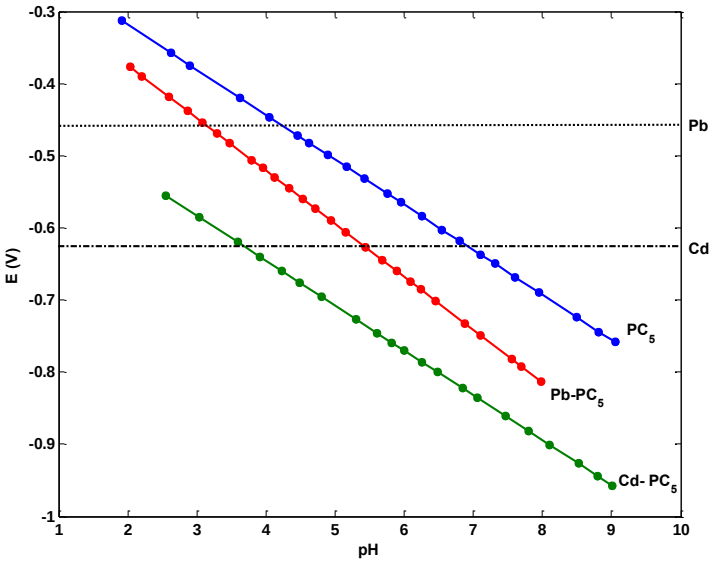


Figure S-6. Evolution of the peaks potentials along pH after application of *pHfit* program for the anodic signal of free PC_5 and the complexes of PC_5 with Cd^{2+} and Pb^{2+}. Discontinuous lines represent the reference reduction potential for Pb^{2+} (E= -0.45 V) and Cd^{2+} (E= -0.62 V) at pH 6.5.

S-2 Voltammetric experiments of competitive binding

S-2.2 Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+}: PC_5 solution.

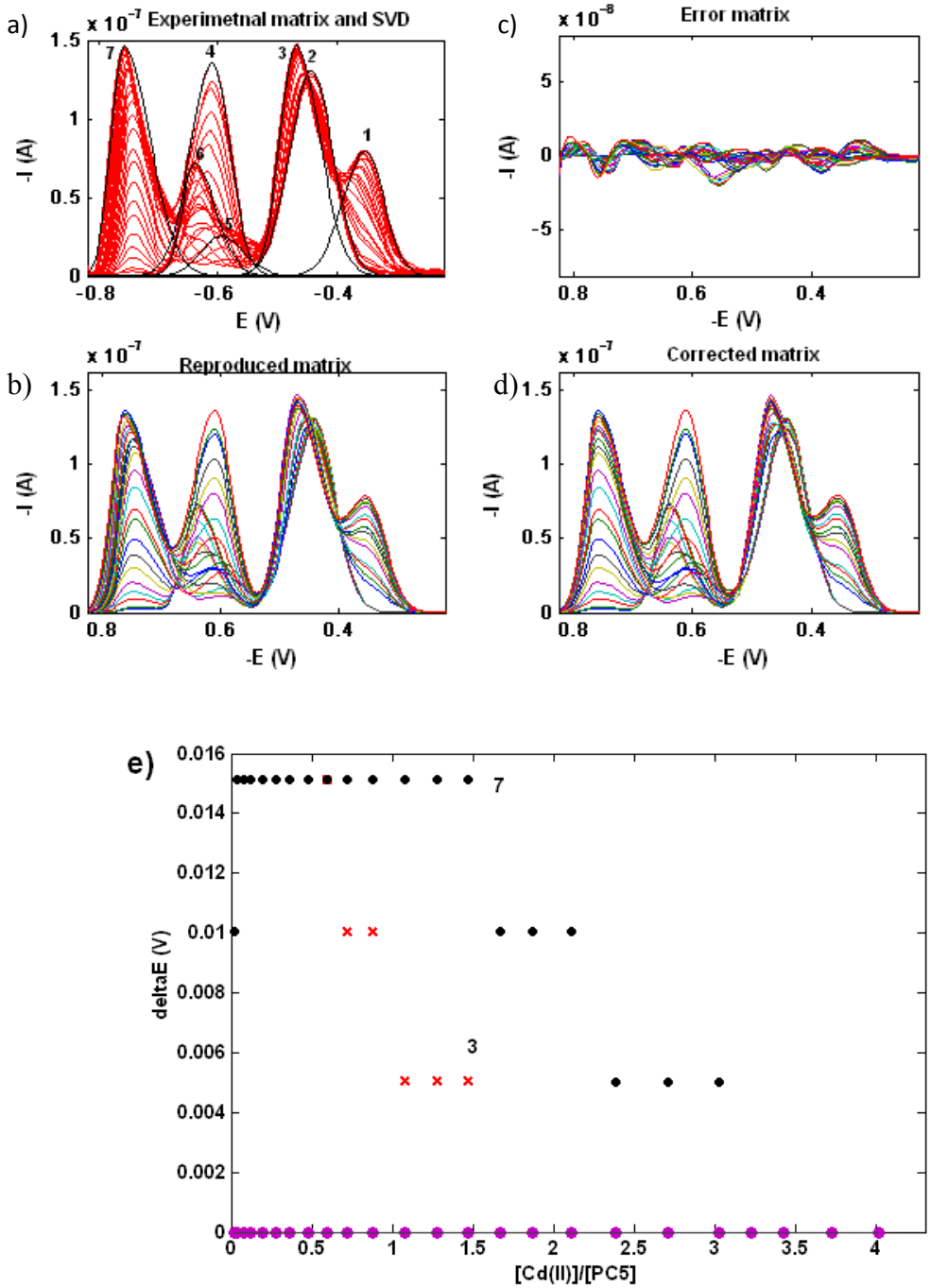


Figure S-7. Experimental voltammograms, with the initial estimation of component (thick lines), for the titration of 2:1 Pb^{2+}:PC_5 with Cd^{2+} in BISTRIS buffer at pH 6.5: (1,2- anodic signals; 3- free Pb^{2+}; 4- free Cd^{2+}; 5- Pb-Cd-PC_5; 6- Pb_2-PC_5; 7- Cd(PC_5) complexes). The application of *SHIFT* program yielded the reproduced data matrix (b), error matrix (c), corrected matrix (d) and potential shifts (e).

2.3 Additions of PC_5 to an equimolar Pb^{2+} : Cd^{2+} solution.

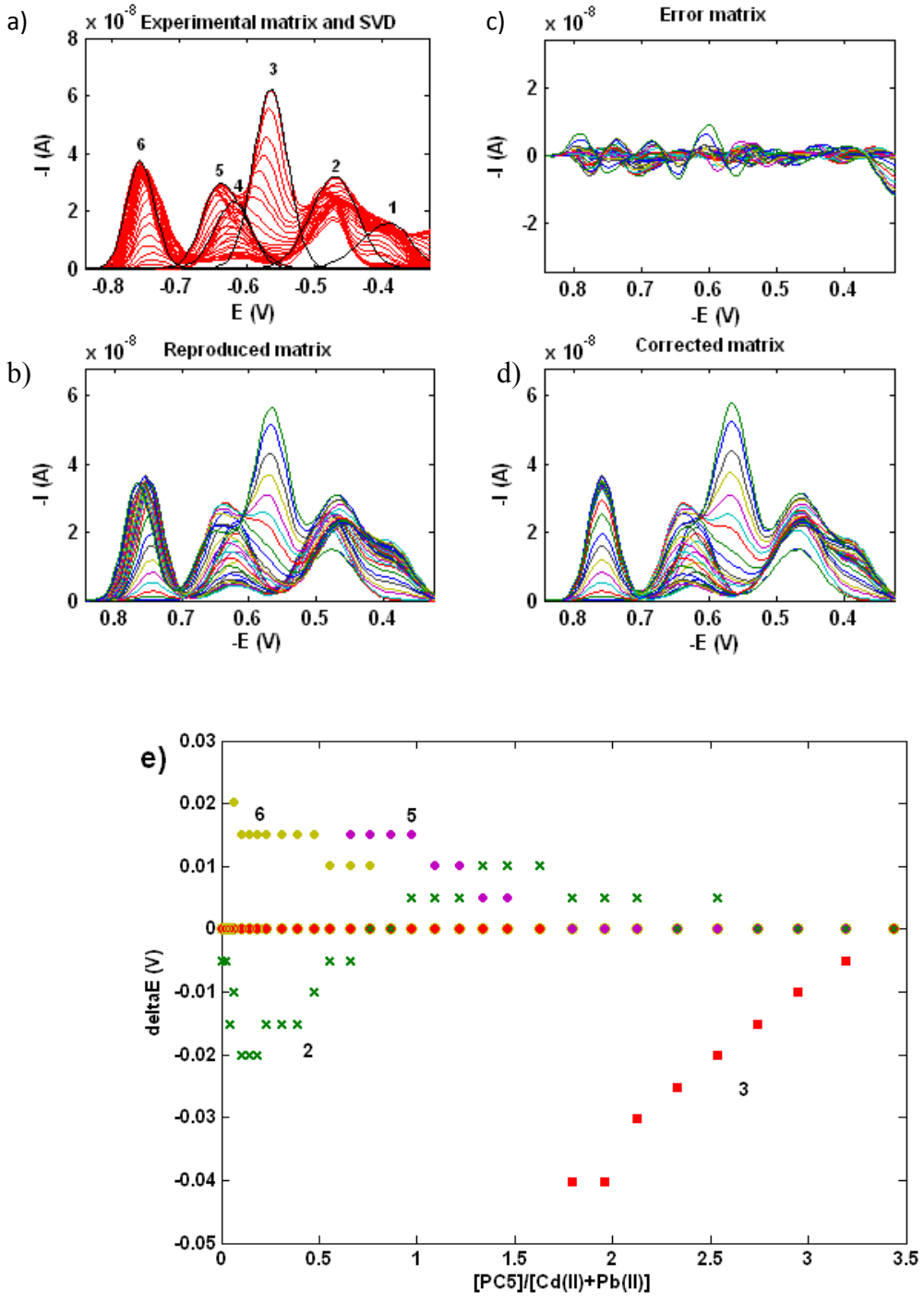


Figure S-8. a) Experimental voltammograms with the initial estimation of component (thick lines): (1,2- anodics signals and free Pb^{2+}; 3- PC_5; 4- free Cd^{2+}; 5- $Pb(PC_5)$ complexes; 6- $Cd(PC_5)$ complexes). The application of *SHIFT* program yielded the reproduced data matrix (b), reproduced matrix (c) error matrix, (d) corrected matrix and (e) potentials shift. Titration of a 1:1 Pb^{2+}:Cd^{2+} with PC_5 in BISTRIS buffer at pH 6.5.

S-3 Circular Dichroism Spectroscopy

S-3.1. Additions of Cd^{2+} to a 2:1 Pb^{2+}:PC_5 solution. In the first step, the initially free PC_5 was complexed when additions of Pb^{2+} were made, and the corresponding complexes were formed. The signal of Pb complexes has three characteristic spectroscopic activity zones: an intense positive band at 240-280 nm, a wider and weaker band at 320-370 nm and a negative band a 280-320 nm. Applied constrain was non-negativity for concentrations, yield MCR-ALS results entail a lack of fit of 7,48%. Figure S9 shows data superimposed with pure CD spectra: for component 1 (free PC_5) and for Pb^{2+} complex (M_2L, component 2), but not for free Pb^{2+} (as expected, because it has no-optical activity). The complex is formed since the beginning of the titration (component 2, maximum at ratio 2). The concentration profile of free PC_5 (component 1, dashed line) really does not hold a reliable result since it depletes only under a ratio-to-ligand value of 1.2.

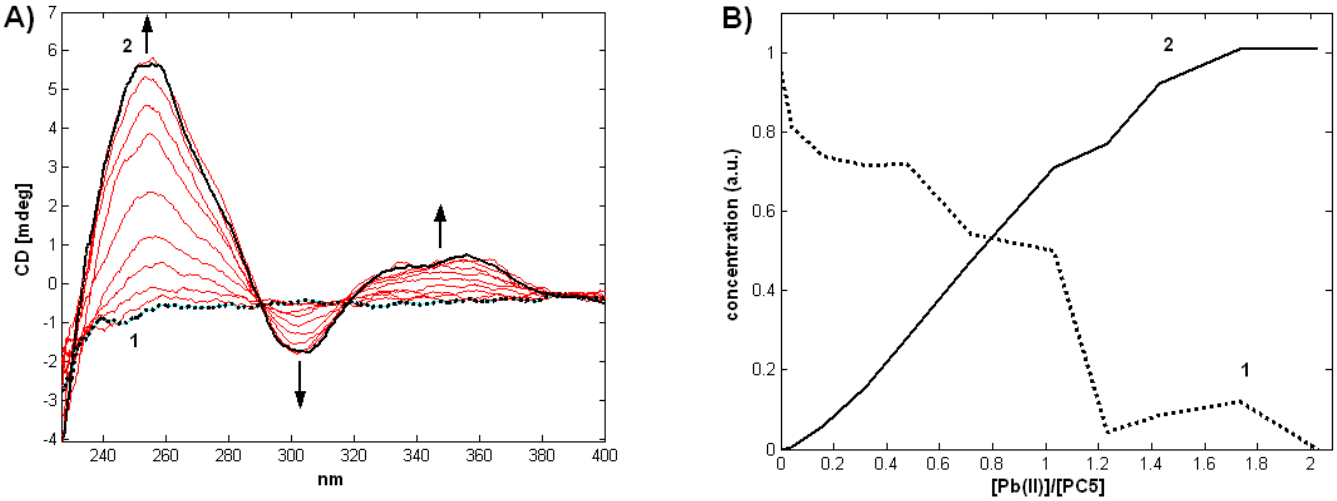


Figure S-9. Circular Dichroism spectra measured during the titration of a 10^{-5} mol L^{-1} PC_5 solution with Pb^{2+}, at pH 6.5 in $5x10^{-3}$ mol L^{-1} BISTRIS-CH_3COOH buffer. Pure spectra used for component estimation (thick lines) (a) and concentration profiles (b) obtained in the MCR-ALS analysis of the spectroscopic matrix. Components are: 1- PC_5; 2- $Pb_2(PC_5)$.

S-3.2 Additions of Pb^{2+} to a 3:1 Cd^{2+}:PC_5 solution.

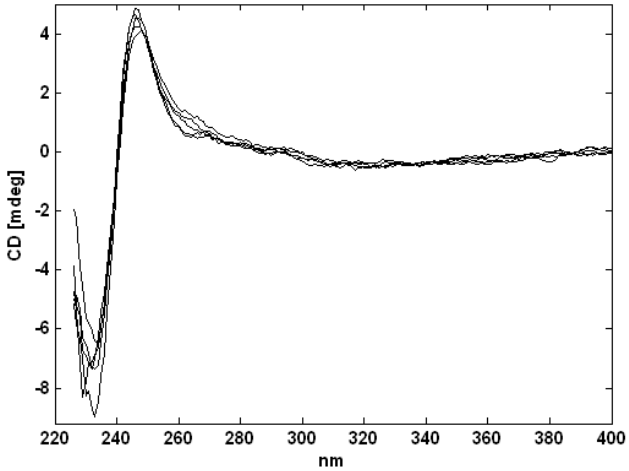


Figure S-10. Circular dichroism spectra measured during the titration of a 3:1 Cd^{2+} - PC_5 solution (10^{-5} mol L^{-1}) with Pb^{2+}, at pH 6.5 in $5x10^{-3}$ mol L^{-1} BISTRIS-CH_3COOH buffer.

S-4 Positive Mode ESI-MS

Table S-1. Molar ratios used for the study metal PC_5 complexes in positive mode ESI-MS. Experiments in $2x10^{-2}$ mol L^{-1} CH_3COONH_4/NH_4OH buffer (pH 6.5). Unitary Concentration $2.5x10^{-5}$ mol L^{-1}.

	Molar Ratio		
Sample	Pb^{2+}	Cd^{2+}	PC_5
S1	1	1	1
S2			2
S3			3
S4	2	0	1
S5		0.5	
S6		1	

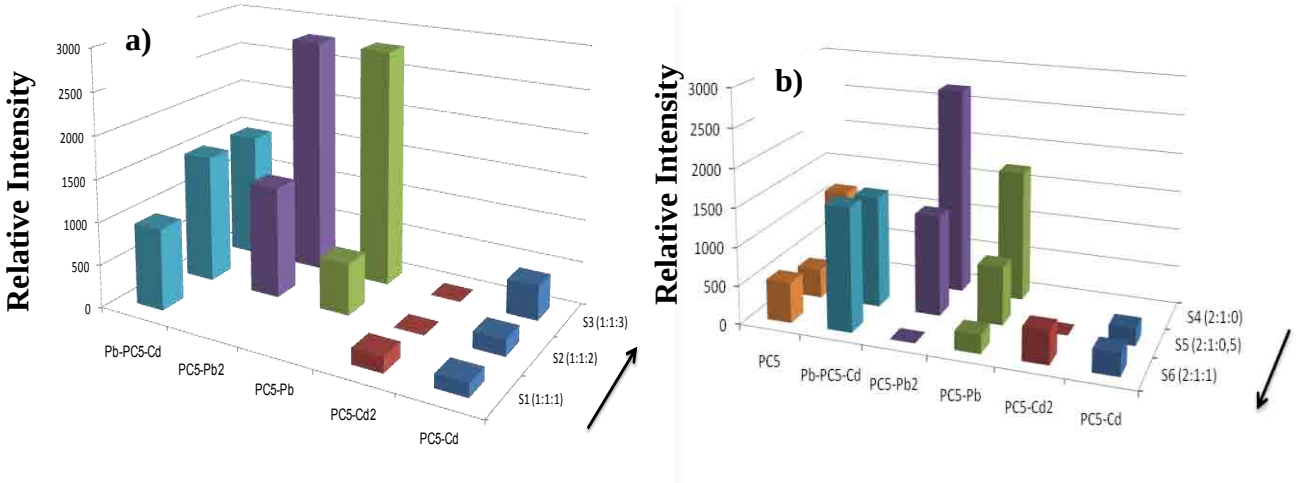


Figure S-11. Relative intensities of ESI-MS peaks obtained for two sets of experiments: (a) Experiments reproducing voltammetric titration in section 2.3 (numbers indicate Pb^{2+}:Cd^{2+}:PC_5 ratios) and (b) in section 2.2 (numbers indicate Pb^{2+}: PC_5:Cd^{2+} ratios).

S-5 Data Treatment. Besides the possible stoichiometries of the complexes, it would be interesting to extract from MCR-ALS results some quantitative information about the equilibrium involved. The binding between Cd and Cys-rich peptides occurs manly through thiol group, yielding inert electroactive complexes with well-defined signals, whose evolution can be used to calculate equilibrium parameters.

A first possible approach consists of the estimation of every equilibrium constant point by point along the titration, using as the concentration of each species the values of the concentration profile of the component (or components) related to the species. However, this method appeared to be unsuccessful, because of very sharp concentration profiles, which made the calculations impossible.

A second possible approach is based on the differences between the reduction peak potentials of unitary voltammograms (results for first and second sections are shown in table 2). They can be related to conditional equilibrium constant K'

through the Nernst equation, written in the form of electrode potentials. Thus, for electrochemical half-reactions of the type (at 25ºC):

$$M + 2e^- \rightarrow M(Hg) \quad (1)$$

$$ML + 2H^+ + 2e^- \rightarrow M(Hg) + H_2L \quad (2)$$

$$\Delta E = E_2^0 - E_1^0 \quad (3)$$

$$\log K' = \frac{nF}{RT}|\Delta E| \quad (4)$$

Where E_1^0 and E_2^0 are the standard potential of process (1) and (2) respectively, which can be estimated from the corresponding peak potential. Indeed, this is an overestimation of the stability constant, since ΔE has not only a thermodynamic component but also a kinetic contribution of the usually irreversible metal complex reduction.

7.3 Discusión de resultados

Como se ha anticipado en la introducción de este Capítulo, en el trabajo 7.2 se ha aplicado un conjunto de técnicas analíticas para obtener los modelos de complejación competitiva entre Cd^{2+} y Pb^{2+} en presencia de la fitoquelatina PC_5. En el primer paso, las valoraciones se han llevado a cabo variando el pH de la disolución (dentro del intervalo 2-9) del ligando sin metal y, posteriormente, en una disolución de relación equimolar metal/ligando. De esta manera se registra la evolución de la complejación ya que, para cada relación metal/ligando y pH del medio, el voltamperograma muestra la fracción del ligando libre, la reducción del exceso de metal libre y las señales de los complejos formados (si son electroactivos). Todo el conjunto de voltamperogramas se organiza en una matriz, la cual se analiza a continuación aplicando el método *pHfit*.

La señal de la fitoquelatina PC_5 (Figura S-1) se desplaza en el eje de potenciales a lo largo de la valoración, lo que implica una pérdida de linealidad de los datos, hecho que impide una resolución satisfactoria de la matriz con MCR-ALS. Se consiguió resolver la matriz con el programa *pHfit*, a pesar de obtener un lof considerable que se debe principalmente al ensanchamiento progresivo del pico, que el programa no consigue modelar. El perfil de PC_5 presenta un considerable desplazamiento de la señal a potenciales más negativos, cuando incrementa el pH. Los dos máximos parecen corresponder a la desprotonación de los grupos carboxilos y tioles. En las valoraciones de pH, los complejos de los metales muestran un comportamiento electroquímico similar en presencia de la fitoquelatina PC_5.

Como en el trabajo 6.3, se hizo una estimación de la constante de estabilidad del complejo metálico a partir de la ecuación de Nernst. El valor máximo de la constante es mayor para el complejo Pb-PC_5 (log K' = 8.7), y tiene un valor más elevado que el de la constante del complejo Cd-PC_5 (log K' = 6.1). Esto es sorprendente ya que implicaría desplazamientos limitados del Pb enlazado a la PC_5 en presencia del Cd. Este resultado se debe a una sobrestimación del parámetro ΔE: como consecuencia que hay una contribución cinética, además de la contribución termodinámica en la reducción irreversible de los complejos del Pb.

En el trabajo se ha llevado a cabo además el estudio de la complejación competitiva entre Cd^{2+} y Pb^{2+} en presencia de la fitoquelatina PC_5 .Se debe considerar que en muchas ocasiones los metales pesados están presentes en los sistemas naturales simultáneamente, de forma que pueden competir con los metales esenciales en los organismos y en el medio ambiente. Por este motivo, el estudio presentado es importante, ya que puede proporcionar las pautas de comportamiento de una biomolécula que afronta la presencia de dos metales toxicos simultáneamente.

Se han realizado los experimentos tanto de adición del ligando a una mezcla equimolar de ambos metales como los experimentos de desplazamiento cuando un metal se añade sobre la disolución en que el otro metal está enlazado con PC_5.

Tanto las valoraciones DPP como las medidas por CD han demostrado que el Pb^{2+} no es capaz de desplazar al Cd^{2+} de sus complejos con PC_5, aunque éste esté en concentraciones elevada en solución. Al revés, el Cd^{2+} desplaza al Pb^{2+} de sus complejos con PC_5 pasando por la etapa de formación del complejo mixto. Los experimentos con ESI-MS también han demostrado que el Cd^{2+} desplaza al Pb^{2+} de sus complejos con PC_5. Además, ESI-MS ha proporcionado las estequiometrías del complejo mixto $CdPb(PC_5)$.

El análisis GPA llevado a cabo con los resultados de la valoración DPP de la mezcla equimolar de los dos metales con PC_5 tampoco permitió la obtención de las estequiometrias debido al elevado

solapamiento de señales, pero a partir del perfil de concentraciones se pudo aclarar la complejación preferente de PC_5 con Cd. La aplicación de GPA a estos datos, que presenta unas señales experimentales bastante complicadas, con muchos componentes, ha confirmado la potencia de análisis de GPA.

7.4 Referencias

1. Scarano, G.; Morelli, E., *BioMetals* **2002,** *15* (2), 145-151.
2. Garg, N.; Aggarwal, N., *Journal of Plant Growth Regulation* **2011,** *30* (3), 286-300.
3. Alberich, A.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2008,** *133* (4), 470-477.
4. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2008,** *42* (8), 2860-2866.
5. López, M. J.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, S.; Manuel Díaz-Cruz, J.; Tauler, R.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2003,** *37* (24), 5609-5616.
6. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Talanta* **2007,** *71* (1), 344-352.
7. Díaz Cruz, J. M.; Sanchís, J.; Chekmeneva, E.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2010,** *135* (7), 1653-1662.
8. Cavanillas, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2011,** *689* (2), 198-205.
9. Alberich, A.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2007,** *584* (2), 403-409.
10. Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Electroanalysis* **2007,** *19* (2-3), 310-317.

Capítulo 8

Estudios de complejación de la selenocistina

8.1 Introducción

Este Capítulo engloba dos trabajos que tienen por finalidad estudiar la complejación entre varios metales y la Selenocistina (SeCyst), utilizando algunas de las técnicas analíticas ya usadas en trabajos anteriores e introduciendo el uso de las valoraciones calorimétricas (ITC) como técnica complementaria para obtener los parámetros termodinámicos de los sistemas estudiados. La utilidad de ITC en este tipo de estudios ya había sido demostrada en anteriores publicaciones del grupo [1 - 4].

En la presente Tesis se ha aplicado la estrategia que combina las valoraciones voltamperométricas (DPP) con el análisis quimiométrico posterior utilizando las nuevas herramientas desarrolladas en el grupo: *pHfit* [5] y GPA [6].

Estos trabajos constituyen una primera aproximación del grupo de Electroanálisis a los ligandos de Selenio. Se considera tanto su comportamiento a diferentes valores de pH como su interacción con diversos iones metálicos. Para ello se han seleccionado, además de los cationes "clásicos" estudiados en anteriores trabajos del grupo (Cd^{2+}, Pb^{2+}, Zn^{2+}), otros considerados de interés biológico (Bi^{3+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} y Ni^{2+}).

Existen muchas formas de selenio presentes en los diversos organismos [7], y se han identificado diversas selenoproteínas cuyas funciones biológicas son aún poco conocidas [8]; por ejemplo la selenoproteína P, que puede presentar varias formas, está presente mayoritariamente en el plasma sanguíneo y se cree que posee una función protectora frente a la presencia de radicales libres o moléculas reactivas en el plasma [9]; la selenoproteína W, encontrada en músculos [10], etc. Los mecanismos reguladores pueden ser responsables de la incorporación preferente de selenio a ciertas proteínas [11].

El aminoácido selenocisteína (SeCys) está presente en la mayoría de las selenoproteínas. Este compuesto es similar a la cisteína (Cys) aunque presenta algunas diferencias, sobre todo en cuanto a sus propiedades químicas. Por ejemplo, en la SeCys el grupo selenol (-SeH) posee un pK_a más bajo (5.2) que el del grupo tiol (>8), y esto hace que esté disociada (forma aniónica) a pH fisiológico [12]. En las plantas, el Se se encuentra en forma de compuestos orgánicos, fundamentalmente como selenometionina (SeMet), pero también en forma de otros compuestos como la SeCyst [13].

En la mayoría de los estudios de especiación de Se, dado el carácter no volátil de estas especies, se utiliza como técnica de separación la cromatografia de líquidos de alta eficacia (HPLC), evitando así el empleo de etapas previas de derivatización [14]. Debido al bajo nivel de concentración en que están presentes las especies de Se en las muestras, su análisis requiere técnicas de alta sensibilidad, como es el caso de ICP-MS [15, 16].

Aunque se ha descrito de forma general el conjunto de rutas bioquímicas y funciones biológicas en las que están implicados los diversos compuestos de Se, hasta ahora no se conocen suficientes detalles para dilucidar el papel exacto de la SeCyst en la red funcional de las células vivas. A pesar del gran número de estudios realizados con tioles, la descripción completa de las propiedades complejantes de los compuestos orgánicos de Se, todavía no está disponible. Esto requiere más información sobre cómo éstos compuestos realizan sus funciones de enlazar los metales.

8.2 *Chemometric analysis of voltammetric data on metal ion binding by Selenocystine*

Los nuevos tratamientos quimiométricos *pHfit* [5] y GPA [6] fueron introducidos anteriormente debido a limitaciones de MCR-ALS en la resolución de matrices con un fuerte solapamiento entre diferentes señales y falta de linealidad. El método se probó inicialmente en valoraciones de cambio de pH con un sistema relativamente sencillo, como el Cd^{2+}-NTA, en que ocurre la formación de un complejo electroactivo. También se aplicó esta metodología a dos sistemas en que también se forman complejos electroactivos, Cd^{2+} en presencia del glutatión (γ-Glu-Cys-Gly, GSH) y de la fitoquelatina PC_2 ((γ-Glu-Cys)$_2$-Gly) [5]. Finalmente, se consideraron datos procedentes de valoraciones en las que se cambia progresivamente el pH, cuyo análisis presenta dificultades considerables, como el mencionado solapamiento y el continuo desplazamiento de potencial de las señales polarográficas.

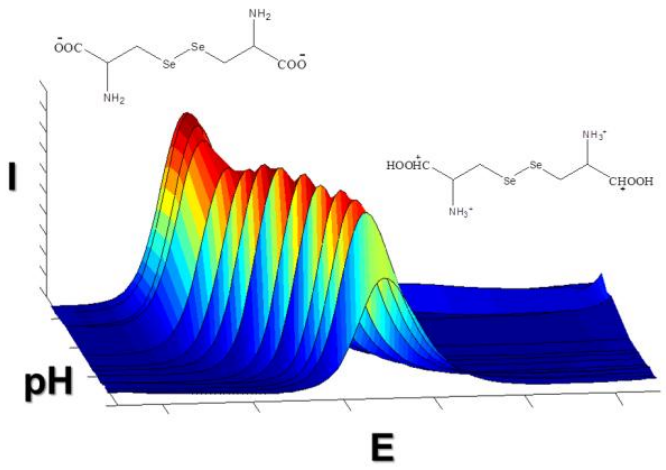
A diferencia de su homólogo de tiol, cistina (Cyst) [17], no existían anteriormente estudios quimiométricos sobre el comportamiento polarográfico de la señal de SeCyst, o de sus complejos, en que se hiciera una valoración de pH. Únicamente se habían publicado estudios de las señales de la SeCyst a diferentes valores de pH, sobre el electrodo de Ag [18] en que se observaba una gran variación de las señales en función de la protonación de los grupos funcionales.

A pesar del gran número de estudios realizados para los sistemas metal-fitoquelatinas (y sus fragmentos), en el grupo de Electroanálisis [1 - 6, 19], aún no se había aplicado esta metodología a ligandos de Selenio. En el presente artículo se estudia el comportamiento electroquímico de la señal del ligando SeCyst, solo y en presencia de un catión metálico, en un amplio intervalo de pH. En primer lugar se presentan los resultados del ligando solo, y seguidamente en presencia de un catión metálico. Además, se comparan los resultados de los dos tratamientos quimiométricos recientemente desarrollados para el conjunto de matrices.

Metal-Ion and pH Dependence of Selenocystine Binding Analyzed by Voltammetry Assisted by Chemometrics

Gusmão, R.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M.

Journal of Physical Chemistry A, 116(25), 6526 - 6531 (2012)



THE JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY A

Article

pubs.acs.org/JPCA

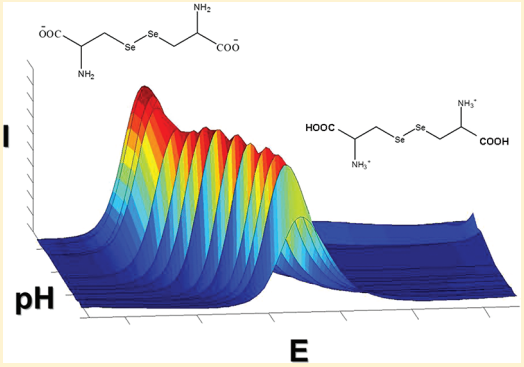
Chemometric Analysis of Voltammetric Data on Metal Ion Binding by Selenocystine

Rui Gusmão, José Manuel Díaz-Cruz, Cristina Ariño, and Miquel Esteban*

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

Supporting Information

ABSTRACT: The behavior of selenocystine (SeCyst) alone or in the presence of various metal ions (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, and Zn^{2+}) was studied using differential pulse voltammetry (DPV) over a wide pH range. Voltammetric data matrices were analyzed using chemometric tools recently developed for nonlinear data: pHfit and Gaussian Peak Adjustment (GPA). Under the experimental conditions tested, no evidence was found for the formation of metal complexes with Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, and Pb^{2+}. In contrast, SeCyst formed electroinactive complexes with Co^{2+} and Ni^{2+} and kinetically inert but electroactive complexes with Cd^{2+} and Zn^{2+}. Titrations with Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} produced data that were reasonably consistent with the formation of stable 1:1 M(SeCyst) complexes.



1. INTRODUCTION

Metal binding is a key process in fields such as catalysis, organometallic reactions, biological regulation, and environmental toxicology. Transition metals play a crucial role in biological systems, where they are always present in the cationic form, binding many different biological molecules.[1] Some first-row transition metals (e.g., Ni, Cu, and Zn) are essential for organisms at low levels; others are present as rare elements (e.g., Co, which is only present in vitamin B12). However, although they have a biological role at low concentrations, they become toxic at high concentrations, and their toxicity remains the subject of extensive research.[2]

Proteins in which Se substitutes S play a variety of important roles in cellular activity[3] and seem to be involved in the chelation of heavy metals[1] as a mechanism of protection against metal toxicity. These findings suggest the potential specificity of Se in binding metals, but the microscopic basis of this behavior remains unknown. As selanyl groups (−SeH) are more acidic than thiol groups ($pK_{thiol} \sim 8.5$ and $pK_{selanyl} \sim 5.2$),[4] selanyls but not thiols are deprotonated at physiological pH and are more reactive than sulfanyls in nucleophilic substitution reactions, which may be one reason why certain biological functions are mediated by selenocysteine (SeCys). Moreover, there are clear differences between SeCys and cysteine (Cys) in terms of nucleophilicity (SeCys > Cys)[5] and reduction potential (140 mV more negative for SeCys than for Cys).[5]

The electrochemical behavior of selenocystine (SeCyst) has previously been studied on Au,[6] Ag,[7] and silver nitrate-modified carbon paste electrodes.[8] SeCyst appeared to be adsorbed on Ag surfaces mainly via the strong Ag−Se binding that developed following Se−Se breakage.

SeCyst, Cys, and cystine (Cyst) have been studied in dilute aqueous acids by cathodic stripping voltammetry (CSV) at a mercury electrode (HMDE).[9] The results revealed the formation of a surface film of mercuro-selenocystinate, which is energetically and kinetically more favorable than the corresponding mercuro-cystinate, prior to the reduction of the amino acids.[10] CSV at HMDE has also been used for speciation analysis of Se.[11,12] Simultaneous determination of Se^{4+} and SeCyst in the aqueous phase and Me_2Se_2 in the organic phase after selective extraction using CH_2Cl_2 was successful.

Electrochemical studies of Se ligands, e.g., selenourea (Se−U) and selenomethionine (SeMet), with metal ions[13,14] revealed that SeMet forms a colloidal complex with Cu^{2+},[13] while it does not interact with Cd^{2+} or Pb^{2+}. In the presence of Zn^{2+}, a soluble complex was formed. In the case of Hg^{2+}, a poorly soluble salt was indicated by a decrease in peak current and virtually constant $E_{1/2}$ values.[14] Pb^{2+} ions also displayed poor affinity for Se−U, and the system was not stable because of Se−U oxidation and hydrolysis. In the presence of Cu^{2+}, Se−U also formed a complex with Cd^{2+}, but with limited solubility, while it did not react with Zn^{2+}.[14]

Chemometric methods (multivariate analysis) can be used with voltammetric data and have been applied in a variety of metal/thiol−peptide systems, including competitive metal complexation by phytochelatins[15] and competitive ligand binding by Cd^{2+}.[16] The results were compared with those of

Special Issue: Herman P. van Leeuwen Festschrift

Received: December 22, 2011
Revised: April 17, 2012
Published: April 18, 2012

ACS Publications © 2012 American Chemical Society

other analytical techniques. The complexation of Se-amino acids SeMet and SeCyst with Hg^{2+} was studied using differential pulse voltammetry (DPV) on a Au-disk electrode. Complexation processes were proposed according to the Gaussian Peak Adjustment (GPA) analysis of the DPV titration data. The main complexes were 1:1 Hg:SeMet and Hg:SeCyst.[17]

We have previously studied the voltammetric behavior of SeCyst at physiological pH in competitive systems, using two complexation models:[18] (i) competitive binding of Zn^{2+} and Cd^{2+} toward SeCyst and (ii) competitive binding of SeCyst and glutathione (GSH) toward Cd^{2+}. In the first case, the presence of two spectroscopically active components, supported by DPV results, allowed us to propose the formation of the ternary ZnCd(SeCyst) complex. In the second case, no interactions between GSH and SeCyst were observed using DPV. Moreover, when SeCyst was added to the Cd^{2+}−GSH system, SeCyst displaced GSH from its Cd^{2+} complexes (mainly $Cd(GSH)_2$), yielding more stable complexes.

Whereas the previous results highlighted the competitive binding behavior of SeCyst at fixed pH, the present work deals with the use of recently developed chemometric tools[19,20] to study SeCyst binding with several metal ions as a function of pH, with the aim of providing valuable information about the involvement of H^+ ions in the electrochemical process and, hence, on the nature of Se−metal binding. For this purpose, pH titrations were performed using DPV to observe the behavior of SeCyst alone and in the presence of various metal ions (Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, and Zn^{2+}) over a wide pH range.

2. EXPERIMENTAL SECTION

2.1. Chemicals and Instrumentation. Selenocystine, (*R*,*R*)-3,3′-diseleno-bis(2-aminopropionic acid), was acquired from Sigma-Aldrich (>98%). Stock solutions (1 mL, 1 mmol L^{-1}) were prepared daily. To ensure homogeneity, solutions were mixed at 2000 rpm for 1 min using an Eppendorf Mixmate and/or sonicated for 5 min.

All other reagents were of analytical grade from Merck. Bi^{3+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, Ni^{2+}, Pb^{2+}, and Zn^{2+} stock solutions (10 mmol L^{-1}) were prepared by dissolving the respective salts in water and were complexometrically standardized. KNO_3 was used as a supporting electrolyte at 50 mmol L^{-1} to ensure ionic strength. All solutions were prepared freshly with buffer deoxygenated using nitrogen. The pH values during the experiments were measured using an Orion SA 720 pH-meter.

Voltammetric measurements via Differential Pulse Voltammetry (DPV) were performed using a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. Working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode (SMDE) with a drop area of 0.9 mm^2, Ag/AgCl, KCl (3 mol L^{-1}), and glassy carbon, respectively, all from Metrohm. Double-distilled Hg was used. The instrumental parameters for DPV experiments were a voltage step of 5 mV, a pulse amplitude of 50 mV, a pulse time of 0.05 s, a drop time of 1 s, and a sweep rate of 50 mV s^{-1}. All experiments were carried out at 25 °C, and purified nitrogen was used for solution deaeration.

2.2. Voltammetric Titrations. DPV measurements were conducted at different pH values for fixed metal-to-SeCyst ratios, with the SeCyst concentration maintained at 10 μmol L^{-1}. In each case, 20 mL of 10^{-5} mol L^{-1} starting solution was placed in the voltammetric cell. After deaerating with pure N_2 for 20 min, initial DP polarograms and pH were recorded. Successive additions of 10^{-3} mol L^{-1} titrant solution were then made, and new polarograms were recorded. After each addition, the solution was purged with N_2 and mechanically stirred for 1.5 min. The data were corrected for dilution effects.

2.3. Voltammetric Data Treatment. Voltammograms were smoothed, baseline-corrected, and converted into data matrices using homemade programs implemented in MATLAB. Chemometric analysis of the data was carried out using several programs also implemented in MATLAB (some of them available at http://www.mcrals.info and http://www.ub.edu/dqaelc), following the general methodology described in previous papers.[17−19] Besides Multivariate Curve Resolution by Alternating Least Squares (MCR-ALS), pHfit and the GPA algorithm (Gaussian Peak Adjustment) were used to correct the progressive potential shifts of several voltammetric signals that decrease the linearity of the data.[19,20]

The chemometric approach pHfit[19] deals with the nonlinear behavior observed in the MCR analysis of certain overlapping voltammetric signals obtained in titrations of metal complexes in which pH is progressively altered. In such cases, nonreversible reduction signals move along the potential axis as a consequence of the involvement of H^+ ions in the electrochemical process and cause a dramatic loss of linearity, which hinders accurate MCR analysis. The pHfit method is based on the least-squares fitting of peak potential vs pH data sets to parametric linear and sigmoid functions through the decomposition of the data matrix into both a concentration profile matrix and a unit signal matrix, in a similar way as MCR-ALS. Such calculations are carried out using several homemade Matlab programs that are freely available. The fitted parameters, along with the evolution of resolved concentrations and potential shifts with pH, provide valuable information on the complexation/reduction processes.

The GPA methodology[20] is based on the fitting of signals to parametric functions. It is used for the MCR analysis of overlapping and peak-shaped voltammetric signals that become progressively broader or narrower and move along the potential axis, resulting in a dramatic loss of linearity. The method is based on the least-squares fitting of Gaussian functions on both sides of the peaks using adjustable parameters for the peak height, position, and symmetry. A brief summary of how the algorithms work is given in the Supporting Information (SI), Flowcharts 1 and 2. Further reading on the different types of peak movement that are expected in voltammetric pH titration can be found in the SI, Section 1.

2.4. Estimation of the Exchange Ratio between Protons and Electrons. When pH variation causes a progressive potential shift of the signals, this can be used to estimate the ratio between "*n*" electrons and "*m*" H^+ ions exchanged in the electrochemical process, according to the slope of the equation deduced from the Nernst equation

$$\text{slope} = -0.059(m/n) \quad (1)$$

where "slope" refers to the slope of the peak potential (in Volts) vs pH plot (assumed to be linear). Although the rigorous application of this equation is restricted to electrochemically reversible processes, it can be extrapolated to nonreversible signals for qualitative purposes.

dx.doi.org/10.1021/jp2123696 | J. Phys. Chem. A 2012, 116, 6526−6531

3. RESULTS AND DISCUSSION

Voltammetric pH titrations of metal−SeCyst systems are especially interesting since they provide stoichiometric information of the complexes involved in H^+-dependent electrochemical processes. Initially, the effect of pH on the electrochemical response of SeCyst in the absence of metal ions was investigated (Figure 1a). The anodic oxidation peak of the Hg electrode in the presence of SeCyst shifted to negative potentials, from −0.55 V (initial pH 2.3) to −0.70 V (final pH 9.4), while the peak current was stable at pH > 4 (Figure 1a). In CSV, the SeCyst signal was attributed to its reduction after the formation of a mercuro−selenocystinate film.[9]

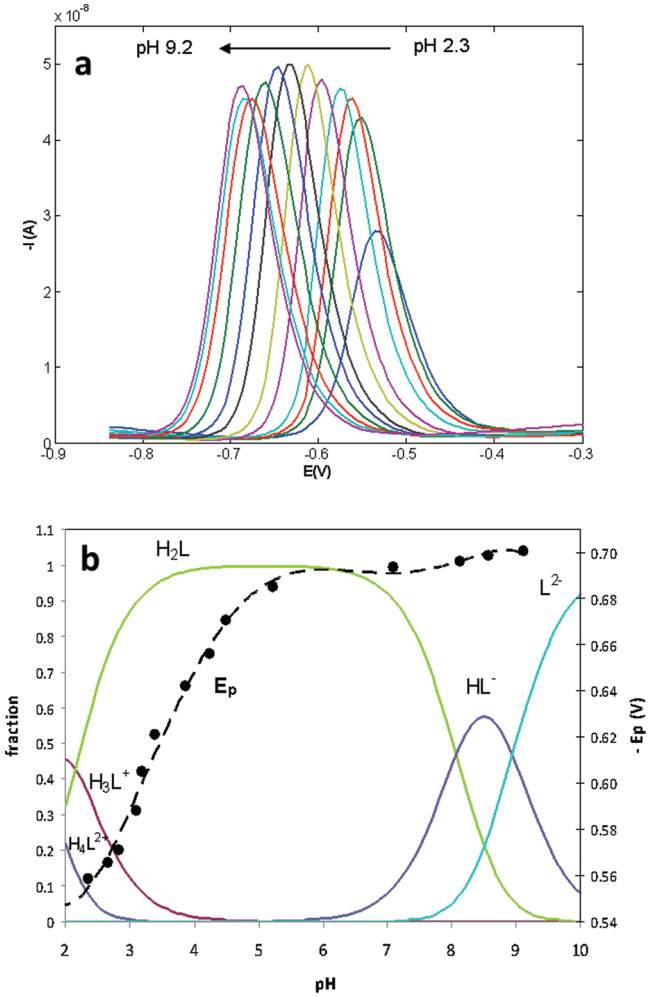


Figure 1. (a) Voltammograms measured during a DPV pH titration of 10 μmol L^{-1} SeCyst. Arrow indicates the signal tendency when changing pH. (b) Distribution of SeCyst species as a function of pH, computed using the acidity constants taken from refs 21 and 22. Overlaid are the E_p values of the anodic process related to SeCyst.

On the basis of SeCyst pK_a values (pK_1 1.68, pK_2 2.15, pK_3 8.07, pK_4 8.94),[21,22] different species may be present in aqueous solutions (see distribution diagram in Figure 1b). SeCyst carries two positive charges at very low pH (located on both protonated amino groups) and one positive charge at low pH and becomes zwitterionic at intermediate pH values. At higher pH values, it carries one negative charge and converts into a divalent anion at high pH.

At a pH ranging from 5 to 8, the SeCyst interaction with the Hg electrode surface is characterized by the formation of Hg−Se and Hg−N bonds and partial deprotonation of the carboxylate group. In Figure 1b, within the pH range in which the SeCyst signal was recorded (see Figure 1a), the signal moves almost linearly in the pH range 2.3−5, with a pattern similar to that of the neutral form of the peptide (H_2L). This suggests that H_2L is the main form that binds Hg, thus producing the anodic signal, and that protonation helps to break diselenide binding.

The interaction of SeCyst with a variety of elements was studied within similar pH ranges. Metal ion/SeCyst voltammograms typically showed many overlapping and moving peaks, which greatly hindered their treatment and further interpretation. Each of these signals can be understood as a single electrochemical process and is associated with a component in the further chemometric treatment.[15] SeCyst exhibited different behaviors depending upon the metal ion. Throughout the present work, all experimental evidence seemed to show that SeCyst is stable in solution and that diselenide disruption does not occur since this is a slow kinetic process that usually involves specific procedures.[23] Under the present experimental conditions, no voltammetric evidence was found for the formation of metal complexes with Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, or Pb^{2+}. As an example, Figure 2a shows the results for Cu^{2+} (other titrations are shown in Supporting Information, Figure S1). The application of the GPA[20] and pHfit[19] algorithms to the data matrix allowed satisfactory mathematical decomposition, thus yielding the concentration profile of each component (Figure 2b). Even in the presence of Cu^{2+} the signal of the SeCyst component showed relatively similar evolution to that of SeCyst alone (shown in Figure 1a), particularly the peak potential at final pH (E = −0.70 V). As shown by the profile of component 1 in Figure 2b, the unbound Cu^{2+} signal decreased as pH increased up to pH ca. 7.

The results for Co^{2+} and Ni^{2+} are rather intriguing because, although complexation can be assumed, it was impossible to track the signal of the metal complex, due to the formation of electroinactive complexes. In the case of equimolar Ni^{2+}:SeCyst at initial pH (Figure 2c), signals were observed for SeCyst (component 1, E = −0.65 V) and Ni (component 3, E = −1.2 V). As pH became less acidic, a new peak appeared in the region of −0.85 V. The GPA algorithm allowed us to obtain the concentration profiles of the three components, with a lack of fit (lof) of 10.3% (Figure 2d). Very weak or no Ni−SeCyst interaction occurred at acidic pHs. As pH increased, the concentration profile of the two components decreased in the same manner, thus suggesting a 1:1 complex stoichiometry, and the new signal that appeared from pH 6 at intermediate potentials (component 2, $E_{\text{final pH}}$ = −0.99 V) was attributed to the formation of a Ni(SeCyst) complex and the anodic reaction of the Hg electrode in the presence of the Ni(SeCyst) complex.

SeCyst formed kinetically inert electroactive complexes with Zn^{2+} and Cd^{2+} (Figure 3) and therefore yielded a reduction signal that could be measured. The signal for the reduction of free Zn^{2+} (component 4, E = −1.15 V) was dominant until pH 5 (Figures 3a and b), along with the signal for SeCyst (component 2, E = −0.65 V). As pH became more alkaline, these peaks decreased with a negligible potential shift for Zn^{2+} reduction (component 4, Figure 3a), and at more negative potentials, a new and very small peak appeared (E_{finalpH} = −1.41 V), implying the formation of some Zn−SeCyst complex (component 5, Figure 3b). Simultaneously, anodic signals from

dx.doi.org/10.1021/jp2123696 | J. Phys. Chem. A 2012, 116, 6526−6531

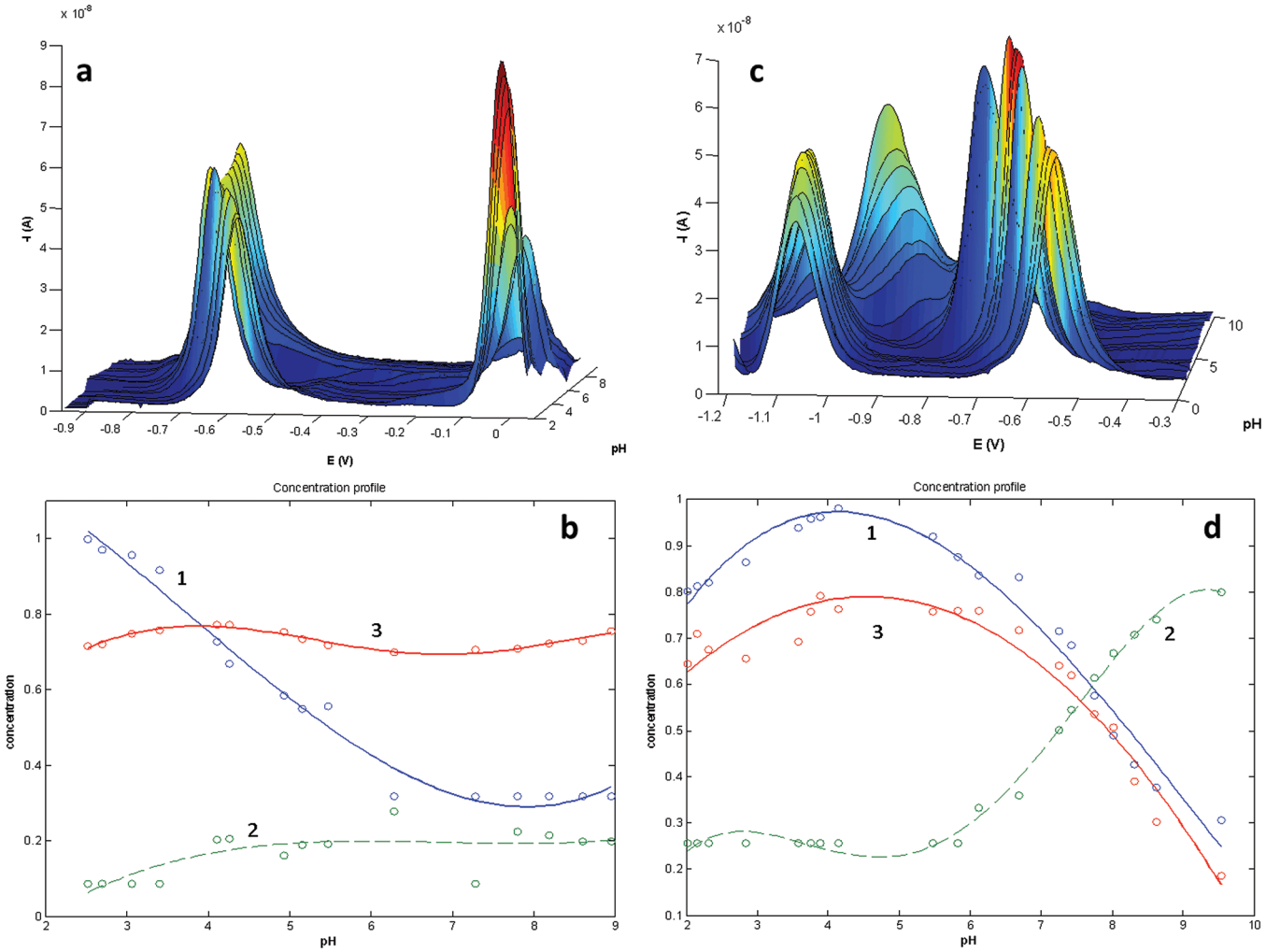


Figure 2. (a) Voltammetric data matrix (current vs potential vs pH) obtained from the pH titration of the equimolar 10 μmol L^{-1} Cu^{2+}–SeCyst system in 50 mmol L^{-1} KNO_3. (b) Concentration profiles obtained using the GPA method with a lof of 16.2%. Components: 1, free Cu^{2+}; 2, anodic baseline distortion; 3, SeCyst. (c) Voltammetric data matrix (current vs potential vs pH) obtained from the pH titrations of the equimolar 10 μmol L^{-1} Ni^{2+}–SeCyst system in 50 mmol L^{-1} KNO_3. (d) Concentration profiles obtained using the GPA method with a lof of 10.3%. Components: 1, SeCyst ; 2, anodic signal of Ni(SeCyst) complex; 3, free Ni^{2+}.

Zn–SeCyst (due to its interaction with the Hg electrode) appeared at intermediate potential (components 1 and 3, $E_{\text{final pH}}$ = −0.86 and −0.94 V, respectively). The low intensity of the signal corresponding to the direct reduction of the Zn–SeCyst complex (component 5) should be noted. This indicates that the reduction process is irreversible. In the unlikely event of diselenide disruption, Zn^{2+} ions are bound to SeCyst through the carboxylate groups, which are deprotonated (amine groups may also make a minor contribution).

In the equimolar Cd^{2+}–SeCyst system (Figures 3c and d) at pH 2.3, Cd^{2+} reduction appeared at −0.61 V (component 3) with an overlapping peak at −0.65 V (component 4), corresponding to the Cd(SeCyst) complex. This was confirmed by the anodic signal at more positive potentials (component 2, E = −0.45 V). Thus, Cd^{2+} is the only ion (of those studied in this paper) able to bind SeCyst even in an acidic medium. This means that the interaction is highly favorable and must occur in a singular manner.

As mentioned earlier, the data set was analyzed using the pHfit and GPA algorithms, and the corresponding results are summarized in Table 1. The lof was considerably higher for pHfit results because, unlike GPA, this algorithm does not fit the peak widths, which are supposed to be constant. However, for the majority of peaks this parameter differs along the pH titration. The movement of the SeCyst signal (Figure 1b) in the absence of a metal ion can be described to a sigmoid with a maximum slope of 0.063 and an inflection point of 3.4. Such adjustments may be affected by the lack of sufficient points in the most acidic pH region, therefore introducing error into the definition of this parameter. The slopes of the SeCyst component (obtained via chemometric algorithms) were consistent throughout the data set, although in some cases hydrolysis of the metal ion resulted in discrepancies between values (e.g., equimolar SeCyst–Pb system, Table 1). The use of GPA allowed satisfactory adjustment of the movement of both the SeCyst (component 2, Figure 3b) and Zn–SeCyst complex (component 5, Figure 3b) to a straight line with a slope of 0.067 and 0.014 V, respectively (Table 1), with a lof of 11.7%. In the Cd/SeCyst system, GPA allowed satisfactory signal adjustment of the movement of the Cd–SeCyst complex (component 4, Figure 3d) with an inflection point of 5.9, a slope of 0.021 V (Table 1), and a lof of 8.5%.

As discussed previously, the slope of E_p vs pH gives the ratio of H^+ and e^- exchanged in the electrochemical reduction of the

dx.doi.org/10.1021/jp2123696 | J. Phys. Chem. A 2012, 116, 6526–6531

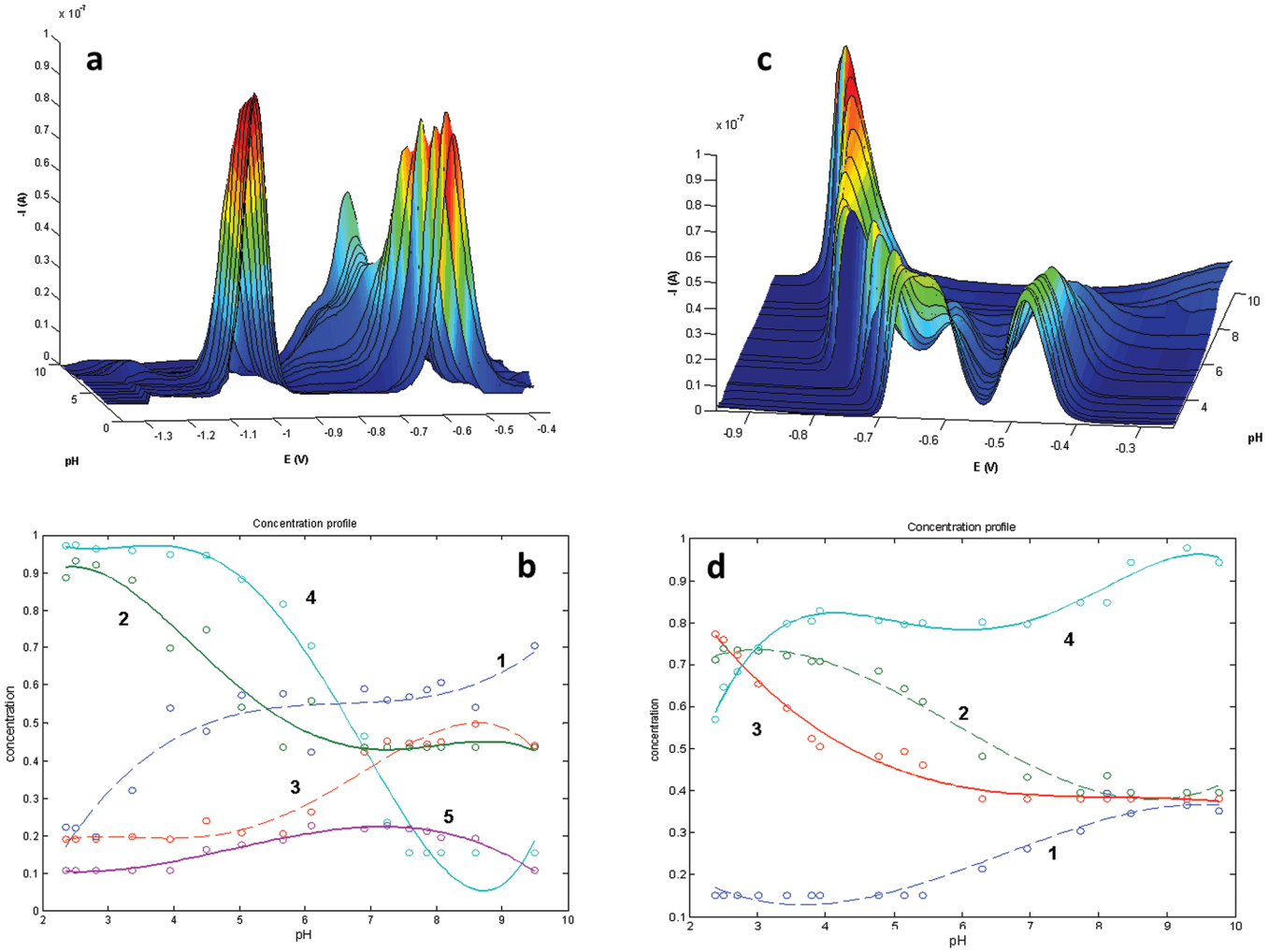


Figure 3. (a) Voltammetric data matrix (current vs potential vs pH) obtained from the pH titration of the equimolar 10 μmol L^{-1} Zn^{2+}–SeCyst system in 50 mmol L^{-1} KNO_3. (b) Concentration profiles obtained using the GPA method with a lof of 11.2%. Components: 1, anodic signal of Zn(SeCyst) complex I; 2, SeCyst; 3, anodic signal of Zn(SeCyst) complex II; 4, free Zn^{2+}; 5, Zn(SeCyst) complex. (c) Voltammetric data matrix (current vs potential vs pH) obtained from the pH titration of the equimolar 10 μmol L^{-1} Cd^{2+}–SeCyst system in 50 mmol L^{-1} KNO_3. (d) Concentration profiles obtained using the GPA method with a lof of 8.5%. Components: 1, anodic signal of Cd(SeCyst) complex I; 2, anodic signal of Cd(SeCyst) complex II; 3, free Cd^{2+}; 4, Cd(SeCyst) complex.

Table 1. Parameters Fitted to the Potential Shifts in Voltammetric pH Titrations of Equimolar SeCyst:M^{2+} and 3:2 SeCyst:M^{3+} Systems According to the GPA and pHfit Approaches[a]

					% lack of fit	
system	component	slope		H^+/e^-	GPA	pHfit
SeCyst	SeCyst	0.063	(±0.001)	1.1	12.1	38.6
SeCyst:Bi^{3+}	SeCyst	0.072	(±0.001)	1.2	20.6	26.1
SeCyst:Cd^{2+}	Cd(SeCyst)	0.021	(±0.001)	0.3	8.5	49.3
SeCyst:Co^{2+}	SeCyst	0.062	(±0.002)	1.1	14.8	26.1
SeCyst:Cr^{3+}	SeCyst	0.063	(±0.002)	1.1	10.7	16.9
SeCyst:Cu^{2+}	SeCyst	0.054	(±0.001)	0.9	16.2	22.5
SeCyst:Ni^{2+}	SeCyst	0.071	(±0.001)	1.1	10.3	17.1
SeCyst:Pb^{2+}	SeCyst	0.045	(±0.001)	0.7	13.2	33.8
SeCyst:Zn^{2+}	SeCyst	0.067	(±0.003)	1.1	11.2	17.9
	Zn(SeCyst)	0.014	(±0.004)	0.2		

[a]For all titrations, the concentration of KNO_3 was 50 mmol L^{-1}, whereas the unitary concentration is indicated with respect to SeCyst (10 μmol L^{-1}). Standard deviations from the respective fittings are given in parentheses.

complex, which is useful in the formulation of complexation models. A H^+/e^- ratio of ca. 1 was obtained for SeCyst alone (in the absence of a metal ion), suggesting that, upon the reduction of Hg_n^{2+} (n = 1 or 2), two protons are driven out throughout SeCyst desorption. The ratios showed good consistency between the data matrices when no complex was

dx.doi.org/10.1021/jp2123696 | J. Phys. Chem. A 2012, 116, 6526–6531

formed, meaning that, in the case of SeCyst, the H^+/e^- ratio was maintained.

Likewise, in data matrices in which complexation occurred but only the SeCyst signal could be followed (Co and Ni), the H^+/e^- ratio of the ligand converged with that for SeCyst alone (Figure 1). For electroactive metal complexes (formed with Cd and Zn), H^+/e^- ratios close to zero seemed to indicate that H^+ ions are not involved in the electrochemical reduction of M^{2+} bound to SeCyst. Hence M^{2+} binding does not break the Se−Se bridge; otherwise, protonation should play a role.

4. CONCLUSION

The use of voltammetry (in the DPV mode) in combination with recently developed chemometric methods, such as GPA, allowed us to study the metal-binding properties of SeCyst over a wide pH range. There was no electrochemical evidence for the formation of metal complexes with Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, and Pb^{2+}. In contrast, SeCyst formed electroinactive complexes with Co^{2+} and Ni^{2+} and kinetically inert but electroactive complexes with Cd^{2+} and Zn^{2+}. An irreversible reduction process was observed in the case of Zn−SeCyst.

Different interactions were observed for the first-row transition metal ions (Cr, Co, Ni, Cu, and Zn) studied herein. To the best of our knowledge, studies on metal binding by SeCyst remain scarce. With respect to copper ions, most studies have dealt with Cu^+ complexation, which is considered responsible for the antioxidant activity of selenium (along with Fe^{2+}).[24] In contrast to Cu^{2+} coordination, experimental NMR results indicate that Cu^+ binds to the Se atom of SeMet.[25] Because Cu^+ typically adopts a tetrahedral coordination geometry, it is probable that many selenium compounds bind Cu^+ through the selenium atom, as well as through the amine nitrogen and/or carboxylate oxygen atom.

It should be noted that SeCyst strongly interacts with silver[7] and that Cu^+ has an electronic configuration similar to that of Ag^+. In contrast, the strong interaction between Cu^{2+} and thiol peptides is also related to the oxidation of thiols to disulfide groups and the reduction of Cu^{2+} to Cu^+, which is not possible in the case of SeCyst (already oxidized).[26]

As for the low affinity of Pb^{2+} for SeCyst, this is not unexpected if we take into account its weaker interaction with the amino groups of the peptide compared with transition metals such as Cd^{2+}, Co^{2+}, and Zn^{2+}. Indeed, a similar explanation was given for the relatively weak binding of Pb^{2+} to glutathione.[27]

Overall, the results presented here are consistent with data at physiological pH for calorimetric titrations of SeCyst with Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+}, and Pb^{2+}, thus confirming the absence of metal binding.[18] Calorimetric titrations with Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} produced curves that were reasonably well fitted by the *one set of sites* model for the formation of stable 1:1 M^{2+}(SeCyst) complexes.[18]

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

S1, Theory; S2, Data treatment; S3, Voltammetric pH titration. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*Fax: (+34) 93 402 12 33. E-mail: miquelestebanc@ub.edu.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471). Rui Gusmão is grateful to MICINN for his Ph.D. grant (BES-2007-15385).

■ REFERENCES

(1) Battin, E. E.; Brumaghim, J. L. *Cell Biochem. Biophys.* **2009**, *55*, 1−23.
(2) Battin, E. E.; Perron, N. R.; Brumaghim, J. L. *Inorg. Chem.* **2005**, *45*, 499−501.
(3) Muttenthaler, M.; Alewood, P. F. *J. Pept. Sci.* **2008**, *14*, 1223−1239.
(4) Steinmann, D.; Nauser, T.; Koppenol, W. H. *J. Org. Chem.* **2010**, *75*, 6696−6699.
(5) Nauser, T.; Dockheer, S.; Kissner, R.; Koppenol, W. H. *Biochemistry* **2006**, *45*, 6038−6043.
(6) Bai, Y.; Wang, T.; Liu, Y.; Zheng, W. *Colloids Surf., B* **2009**, *74*, 150−153.
(7) Lim, J. K.; Joo, S.-W. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *605*, 68−72.
(8) Bai, Y.; Wang, Y. d.; Zheng, W. j.; Chen, Y. s. *Colloids Surf., B* **2008**, *63*, 110−115.
(9) Grier, R. A.; Andrews, R. W. *Anal. Chim. Acta* **1981**, *124*, 333−339.
(10) Ochsenkuhn-Petropoulou, M.; Tsopelas, F. *Anal. Chim. Acta* **2002**, *467*, 167−178.
(11) Ochsenkuhn-Petropoulou, M. T.; Tsopelas, F. N. *Anal. Bioanal. Chem.* **2004**, *379*, 770−776.
(12) Tsopelas, F. N.; Ochsenkuhn-Petropoulou, M. T.; Tsantili-Kakoulidou, A.; Ochsenkuhn, K. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2005**, *381*, 420−426.
(13) Feroci, G.; Fini, A.; Badiello, R.; Breccia, A. *Microchem. J.* **1997**, *57*, 379−388.
(14) Feroci, G.; Badiello, R.; Fini, A. *J. Trace Elem. Med. Biol.* **2005**, *18*, 227−234.
(15) Gusmão, R.; Cavanillas, S.; Ariño, C.; Diaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9006−9013.
(16) Gusmão, R.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M. *Anal. Biochem.* **2010**, *406*, 61−69.
(17) Gilsanz, C.; Gusmão, R.; Chekmeneva, E.; Serrano, N.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 5988−5992.
(18) Gusmão, R.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2012**, *17*, 321−329.
(19) Díaz Cruz, J. M.; Sanchís, J.; Chekmeneva, E.; Ariño, C.; Esteban, M. *Analyst* **2010**, *135*, 1653−1662.
(20) Cavanillas, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 198−205.
(21) Goessler, W.; Kuehnelt, D.; Schlagenhaufen, C.; Kalcher, K.; Abegaz, M.; Irgolic, K. J. *J. Chromatogr., A* **1997**, *789*, 233−245.
(22) Liu, Q.; Wang, X.; Yang, X.; Liang, X.; Guo, Z. *J. Inorg. Biochem.* **2010**, *104*, 1178−1184.
(23) Zheng, J.; Ohata, M.; Furuta, N.; Kosmus, W. *J. Chromatogr., A* **2000**, *874*, 55−64.
(24) Battin, E. E.; Zimmerman, M. T.; Ramoutar, R. R.; Quarles, C. E.; Brumaghim, J. L. *Metallomics* **2011**, *3*, 503−512.
(25) Wang, H. C.; Riahi, M.; Pothen, J.; Bayse, C. A.; Riggs-Gelasco, P.; Brumaghim, J. L. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 10893−10900.
(26) Leal, M. F. C.; van den Berg, C. M. G. *Aquat. Geochem.* **1998**, *4*, 49−75.
(27) Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Díaz-Cruz, M. S.; Ariño, C.; Esteban, M.; Tauler, R. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *516*, 110−118.

Supporting Information

Chemometric analysis of voltammetric data on metal ion binding by Selenocystine

Rui Gusmão, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz and Miquel Esteban*

Departament de Química Analítica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Martí i Franquès 1 - 11, E - 08028 - Barcelona (Spain)

Phone: (+34) 93 402 15 45. Fax: (+34) 93 402 12 33.

*to whom correspondence should be addressed

E-mail: miquelestebanc@ub.edu

S1. Theory

S2.Voltammetric pH titration

S3. Data Treatment

S1. Theory

Consider a metal ion M^{n+} that is reversibly reduced at a mercury electrode to the amalgam M(Hg) and also reacts with a ligand H_mL to form the electrochemically inert and electroactive complex $ML^{(n-m)+}$ in solution. Electrochemically inert means that the association-dissociation kinetics of the complex is so slow that it practically does not dissociate during the time scale of the electrochemical measurement. If the protonation equilibria of the ligand are involved in the electrochemical reaction, the reduction of M^{n+}-ions takes place according to different simultaneous processes:

i) $M^{n+} + ne^- \rightleftharpoons M(Hg)$

ii) $MLH_m^{n+} + ne^- \rightleftharpoons M(Hg) + H_mL$

iii) $ML^{(n-m)+} + mH^+ + ne^- \rightleftharpoons M(Hg) + H_mL$

iv) $ML^{(n-m)+} + ne^- \rightleftharpoons M(Hg) + L^{m-}$

Usually, reaction i) takes place at potentials quite less negative than those of processes ii)-iv), thus producing a separate signal for the reduction of the free metal ion, which, for the totally inert case, remains at constant potential. In contrast, processes ii) - iv) are simultaneous and compete with each other to produce a signal which moves along the potential axis, depending on the predominance of one or the other. It must be noted that reaction ii) will only occur when the complex is protonated without dissociation (*e.g.* if some electron pairs of the ligand remain available for coordination after metal ion binding). A very simple but still useful approach consists of writing the Nernst expression of half-reaction iii):

$$E = E^{0'} + \frac{0.058}{n}\log\frac{[H_mL]}{[ML^{(n-m)+}][H^+]^m} \quad (1)$$

where $E^{0'}$ is the formal potential and 0.058 is given at 20ºC. If we rearrange this equation, we find:

$$E = E^{0'} - 0.058\frac{m}{n}pH + \frac{0.058}{n}\log\frac{[H_mL]}{[ML^{(n-m)+}]} \quad (2)$$

which suggests that the evolution of the peak potential of the signal (E_p) as a function of pH should follow a linear relationship of the type:

$$E_p = k - 0.058\frac{m}{n}pH \quad (3)$$

with k being a constant related to $E^{0'}$. This means that the slope of an E_p *vs*. pH linear plot leads to the obtaining of the ratio between the protons and electrons exchanged in the electrochemical reduction of the complex, which is useful in the formulation of complexation models.

Unfortunately, experimental systems do not behave in such a simple way. Firstly, Equations (1)-(3) depict a situation of electrochemical equilibrium, i.e. a reversible system, and the reduction of inert complexes is

typically non-reversible. Indeed, Koryta proposed for NTA a kinetic model with a pH-dependent dissociation constant of the complex (k_d) according to the expression:

$$k_d = k^0 + k^1 [H^+] \quad (4)$$

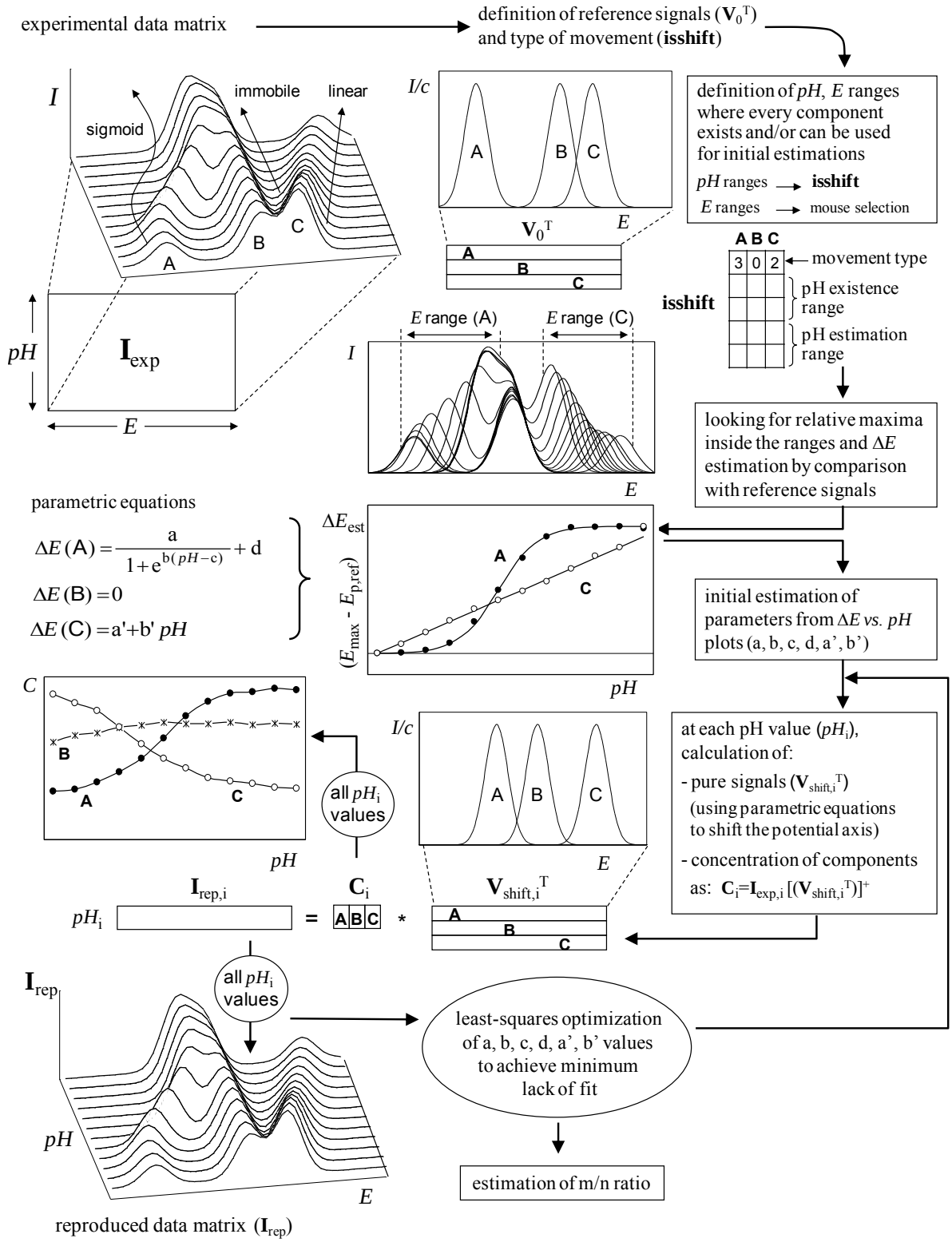
where k^0 and k^1 are rate constants. Secondly, the situation seems quite dependent on the distribution of the differently protonated species of the free ligand. For instance, process iii) becomes negligible at too high pH values (the concentration of H^+ is too small to protonate either the ligand or the complex) or too acidic pH values (the ligand is already protonated in the complexed form or complexation is negligible), whereas processes ii) or iv) are unaffected by pH variation, provided that complexation still takes place and the free metal is not hydrolyzed. These considerations are confirmed by the sigmoid evolution of many experimental ΔE vs. pH plots. To model this behavior, we chose a parametric sigmoid equation in the form:

$$\Delta E = \frac{a}{1+e^{b(pH-c)}} + d \quad (5)$$

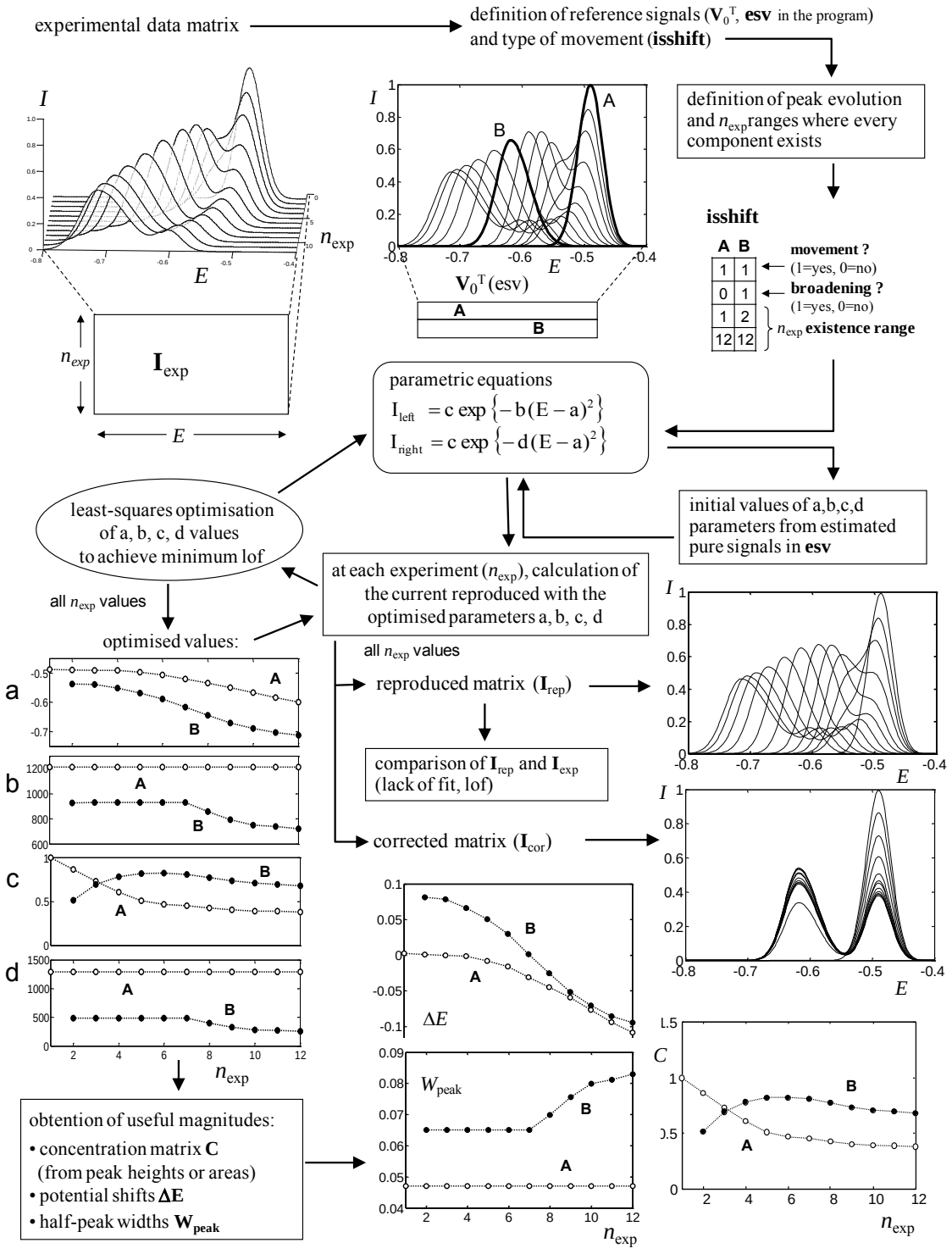
with a, b, c, d being adjustable parameters: a is the height of the function, *i.e*. the difference between the lower and upper limits of ΔE, and can be positive or negative depending on the 'up-down orientation' of the function; b is related to the slope in the region close to the inflexion point and can also be positive or negative depending on the 'left-right orientation' of the function; c is the pH of the inflexion point; and d is the vertical displacement (positive or negative) of the sigmoid from the zero baseline (d ≠ 0 means a sigmoid with both a positive and a negative section).

Further reading on theoretical aspects of the data treatment can be found in Ref. 19 and 20.

S2. Data Treatment



Flowchart 1 - Method for non-linear multivariate curve resolution analysis of voltammetric pH titration datasets by means of pHfit program, as seen in reference 19. The proposed example includes three kinds of signals depending on their evolution with pH: sigmoid (A), immobile (B) and linear (C).



Flowchart 2 - Methodology for non-linear multivariate curve resolution analysis of a voltammetric titration dataset by means of GPA programs, as seen in Reference 20.

S3. Voltammetric pH titration

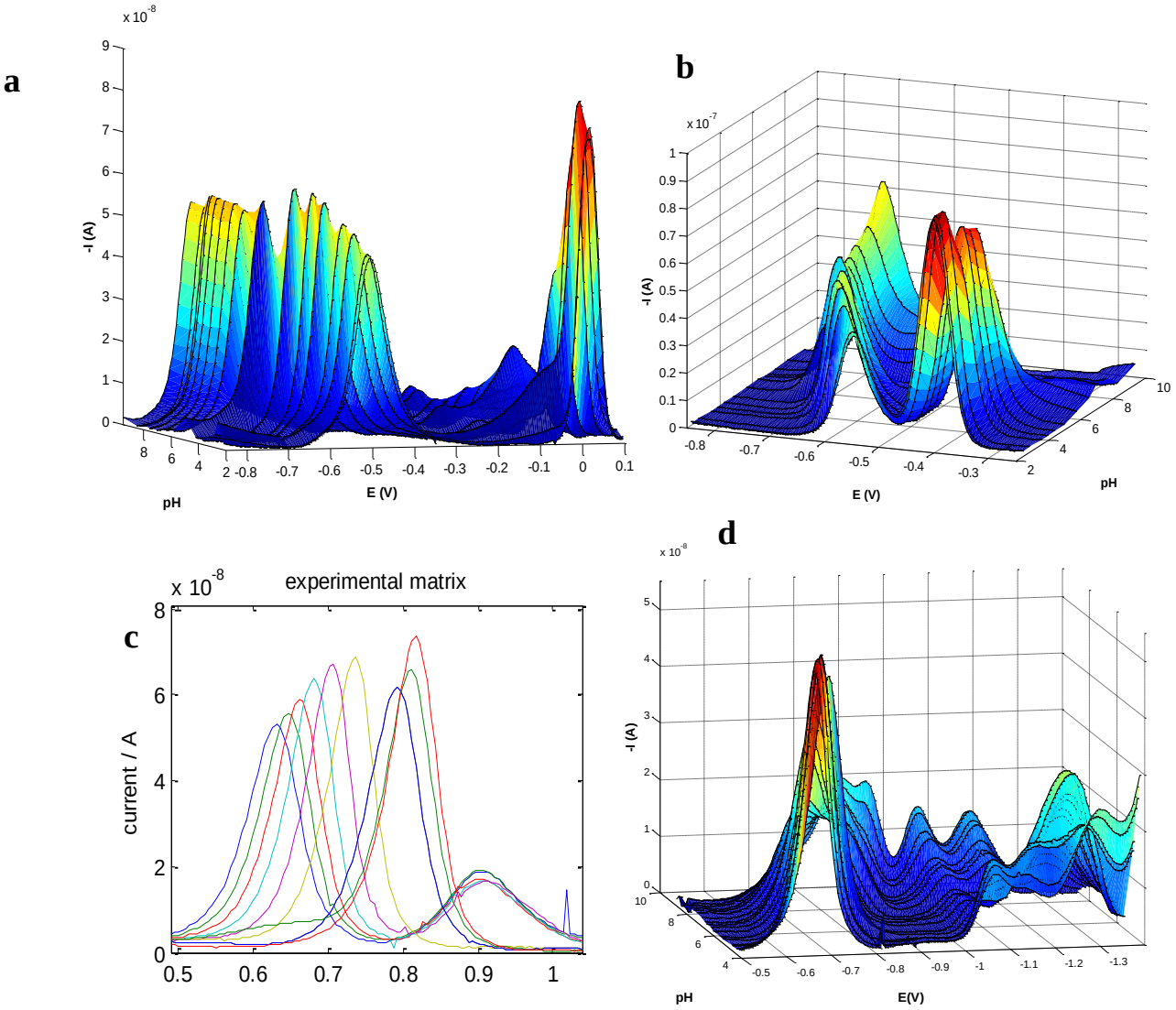


Figure S1 – Voltammetric data matrix (current *vs.* potential *vs*. pH) obtained in the DPP pH titration of 3:2 SeCyst : M^{3+} (a – Bi^{3+}; b – Cr^{3+}) and equimolar SeCyst : M^{2+} (c – Pb^{2+}; d – Co^{3+}) systems, in 50 mmol L^{-1} KNO_3. The unitary concentration is indicated with respect to SeCyst (10 μmol L^{-1}). Axes are differently disposed for a better perspective of signals evolution.

8.3 *Combination of chemometrically assisted voltammetry, calorimetry, and circular dichroism as a new method for the study of bioinorganic substances: application to selenocystine metal complexes*

En el seguimiento del trabajo anterior, en un primer apartado se ha descrito el estudio de la complejación de la SeCyst con los metales mediante valoración isotérmica calorimétrica (ITC). Las concentraciones relativamente elevadas que requieren la mayor parte de las técnicas estándar de determinación estructural (como es el caso de la resonancia magnética nuclear, RMN) dificultan su uso en muchos de los casos de la investigación de los complejos metálicos. Con las valoraciones por ITC se intentó obtener información cinética y termodinámica de los complejos de la SeCyst y una confirmación de los datos obtenidos en el trabajo anterior, que pueden ser útiles para la comprensión de las funciones biológicas de la SeCyst. De hecho, esta técnica ha sido de gran utilidad en el estudio de la complejación de iones metálicos [1-4], especialmente por parte de ligandos que contienen grupos tiol [20, 21].

En la bibliografía se encuentran escasos trabajos de estudios calorimétricos de compuestos orgánicos de selenio, pero ninguno con la SeCyst, ya que muchos de estos ligandos deben obtenerse sintéticamente, son biológicamente activos y se degradan con la temperatura. Precisamente existen estudios sobre dicha degradación (y fusión) en función de la temperatura por calorimetría de barrido diferencial (DSC) [22, 23].

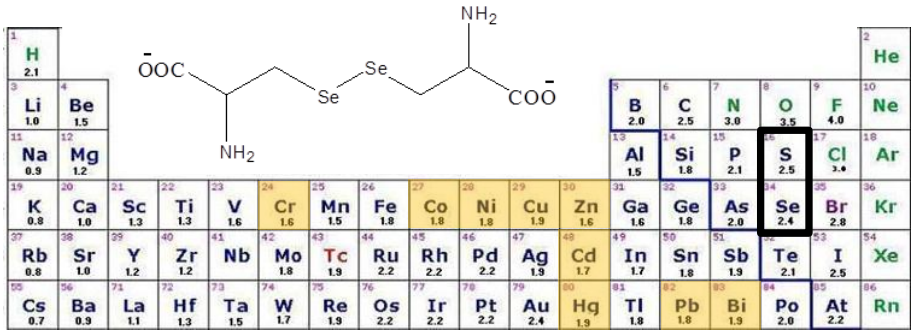
Una vez obtenidas las características individuales de las interacciones entre cada metal y la SeCyst, con los datos del trabajo anterior, las valoraciones por ITC nos permitirán realizar un análisis más completo de varios sistemas. Concretamente, hemos podido obtener los parámetros termodinámicos que determinan el curso de las interacciones y la estabilidad de los complejos. A continuación, se han considerado dos situaciones típicas de complejación competitiva. En la primera situación se ha analizado, mediante técnicas utilizadas previamente en esta tesis (DPP/GPA y CD/MCR-ALS), la competencia entre Cd^{2+} y Zn^{2+}. Mientras que en el capítulo anterior se estudiaba el caso de la competición de la PC_5 en presencia de dos iones metálicos tóxicos (Cd^{2+} y Pb^{2+}), en este caso tenemos la presencia de un ion metálico claramente toxico (Cd^{2+}) y otro ion esencial, como es el Zn^{2+}, que, dependiendo de su concentración, puede ser perjudicial para varios procesos biológicos [24].

Finalmente, y con el propósito de aportar nuevos datos a la interacción de Se y S, en el presente capítulo analizamos un último ejemplo de gran interés, como es la complejación de mezclas de ligandos en que están presentes calcógenos diferentes (O, S y Se). Una diferencia importante entre los ligandos que contienen esos átomos es que, en el caso del GSH, la complejación puede ocurrir a través del grupo –SH terminal, mientras que en el caso de la SeCyst existe un enlace Se-Se que impide *a priori* que se forme un enlace directo con el grupo -SeH.

Combination of chemometrically assisted voltammetry, calorimetry, and circular dichroism as a new method for the study of bioinorganic substances: application to selenocystine metal complexes

Gusmão, R.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J.M.; Ariño, C.; Esteban, M.

Journal of Biological Inorganic Chemistry, 17(2), 321 - 329 (2012).



J Biol Inorg Chem (2012) 17:321–329
DOI 10.1007/s00775-011-0853-0

ORIGINAL PAPER

Combination of chemometrically assisted voltammetry, calorimetry, and circular dichroism as a new method for the study of bioinorganic substances: application to selenocystine metal complexes

Rui Gusmão · Rafel Prohens · José Manuel Díaz-Cruz · Cristina Ariño · Miquel Esteban

Received: 3 March 2011 / Accepted: 6 October 2011 / Published online: 21 October 2011
© SBIC 2011

Abstract Selenium-containing compounds play an important role in antioxidant defense systems, binding to toxic metals, preventing their uptake into cells, and thus protecting cells from metal-induced formation of reactive oxygen species. Here, we present a proposal for a relatively new method as a complement to the more usual methods used in selenium studies. A systematic study of the metal-binding properties of selenocystine (SeCyst) in the presence of divalent metal cations (Cd, Co, Hg, Ni, and Zn) is reported. Isothermal titration calorimetry provides thermodynamic parameters of the systems. Titrations produced curves that could be fit reasonably well to the *one set of sites* model. The data clearly demonstrate that one M^{2+} binds one SeCyst molecule, and the stable M(SeCyst) complex is formed under these conditions. The order of the SeCyst binding constant for the metal ions is $Hg^{2+} > Cd^{2+} \sim Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$. Cadmium ion was selected as a modulator for the behavior of SeCyst in the presence of a nonessential metal, and zinc was selected for the case of an essential element. These interactions of SeCyst with Cd^{2+} and Zn^{2+}, either individually or combined, were studied in aqueous buffered solutions at physiological pH by differential pulse polarography and circular dichroism spectroscopy. Furthermore, recently developed chemometric tools were applied to differential pulse polarography data obtained in mixtures of SeCyst and glutathione in the presence of Cd^{2+} at physiological pH.

Keywords Metal binding · Voltammetry · Isothermal titration calorimetry · Circular dichroism · Chemometrics

Abbreviations

CD	Circular dichroism
Cys	Cysteine
DPP	Differential pulse polarography
GPA	Gaussian peak adjustment
GSH	Reduced L-glutathione
ITC	Isothermal titration calorimetry
MCR-ALS	Multivariate curve resolution with alternating least squares
SeCys	Selenocysteine
SeCyst	Selenocystine
SelP	Selenoprotein P
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethane

Introduction

Selenopeptides and sulfopeptides play a major role in oxidative stress protection [1–3] and programmed cell death [4] in living organisms. The importance of selenium biochemistry has been known for many years [5], and it is largely attributed to the presence of selenium in selenoproteins through selenocysteine (SeCys) [6]. Several

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00775-011-0853-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

R. Gusmão · J. M. Díaz-Cruz · C. Ariño · M. Esteban (✉)
Departament de Química Analítica,
Facultat de Química, Universitat de Barcelona,
Martí i Franquès 1-11,
08028 Barcelona, Spain
e-mail: miquelestebanc@ub.edu

R. Prohens
Plataforma de Polimorfisme i Calorimetria,
Centres Científics i Tecnològics,
Universitat de Barcelona,
Barcelona Science Park,
Baldiri Reixac 10,
08028 Barcelona, Spain

selenium-dependent enzymes have been identified in which SeCys is inserted in the catalytic site. Selenoenzymes, such as formate dehydrogenase from bacteria, and the glutathione peroxidases, thioredoxin reductases, and type 1 iodothyronine deiodinases family of enzymes from animals, are involved in redox reactions in which the selenium atom (present in the reduced selenol form SeCys) functions as an active-site residue essential for catalytic activity (redox center) [6]. Mutagenesis studies have shown that this SeCys residue plays a critical role because replacement of the active-site SeCys by a cysteine (Cys) residue greatly reduced catalytic activity [7, 8].

Selenium and the biologically more common chalcogen sulfur are similar in many aspects, including electronegativity, atom size, and accessible oxidation states. However, there are some clear differences between SeCys and its sulfur counterpart Cys, including side-chain pK_a [9], nucleophilicity (SeCys > Cys) [10], and reduction potential (140 mV lower for SeCys as compared with Cys) [11].

Presumably, the chemical properties of selenium underlie the biological utility of this residue [12]. SeCys is found in enzymatic active sites, where its known functions include acting as a nucleophile, a metal ligand, or a redox element [13]. Selenium atoms provide SeCys with properties quite different from those of Cys with respect to metal binding and sequestration capacity. Therefore, it is of great biological interest to study the interactions of selenopeptides and sulfopeptides in the presence of essential and nonessential metals. Selenocystine (SeCyst) is a cystine residue analogue with a diselenide bond in place of the disulfide bond in cystine. Diselenide bonds are intrinsically more stable than disulfide bonds. Surprisingly, the greater thermodynamic stability of diselenide bonds relative to disulfide bonds is not matched by a corresponding decrease in reactivity [14, 15].

Because selenol groups (–SeH) are distinctly more acidic than thiol ones (–SH) (pK_{thiol} ~8.5 and p$K_{selenol}$ ~5.2) [9], selenols but not thiols are deprotonated at physiological pH and are more reactive than thiols in nucleophilic substitution reactions, which may be one reason why certain biological functions are mediated by SeCys. The electron-rich selenide is surely also a target for oxidants, and the ready accessibility of the radical oxidation state may also point to additional reactions facilitated by selenoproteins.

The antioxidant activity of sulfur- and selenium-containing compounds has led researchers to focus intensely on developing these compounds to treat or prevent diseases. Evidence that metal coordination leads to antioxidant activity is supported by the findings of in vitro studies investigating metal-mediated oxidative stress and disease [16]. Selenomethionine, SeCyst, or methylselenoncysteine prevent metal-mediated DNA damage [17].

Selenoprotein P (SelP) is one of the major selenoproteins in human blood plasma and it has been postulated to transport selenium from liver to various other organs, including brain [18]. SelP is different from all other selenoproteins, as it incorporates multiple SeCys residues per protein molecule [2]. Few proteins have two SeCys residues in close enough proximity to facilitate diselenide formation (SeCyst), perhaps with the exception of SelP, which contains up to ten SeCys residues.

There is increasing evidence that SelP acts as a scavenger of free radicals in cellular defense against oxidative injury. In addition to selenium transport, SelP may serve as a heavy-metal chelator [19, 20], presumably by forming nontoxic metal complexes, thus preventing neurotoxicity [18] and protecting against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration [18]. As an antioxidant and metal chelator, SelP may function through interactions at the cell surface, binding to toxic metals, preventing their uptake into cells, and thus protecting cells from metal-induced formation of reactive oxygen species.

The electrochemical behavior of SeCyst has been studied on gold [21], silver [22], and silver nitrate modified carbon paste [23] electrodes. SeCyst appeared to be adsorbed on silver surfaces mainly via the strong Ag–Se bond developed after breakage of the Se–Se bond.

Chemometric (multivariate analysis) methods can be used with voltammetric data, and have been satisfactorily applied in a variety of metal/thiol–peptide systems [24], including the competitive metal complexation by phytochelatins [24, 25] and the competitive ligand binding by cadmium [25]. Results were compared with those from other analytical techniques [26].

In the present work, for the first time, the methods developed in the study of metal/thiol–peptides plus some recently developed chemometric tools [27] are applied to investigate SeCyst in the presence of several metal ions (Cd, Co, Hg, Ni, and Zn). The metal binding of SeCyst is analyzed by the use of several techniques: voltammetry (in the mode of differential pulse polarography, DPP) assisted by a new chemometric method [27], isothermal titration calorimetry (ITC), and circular dichroism (CD) spectroscopy. These observations were compared with ITC data, which also provided thermodynamic parameters for each system. Conditional equilibrium constants for complex formation obtained by DPP and ITC are reported and compared.

Additionally, the interactions of SeCyst with Cd^{2+} and Zn^{2+}, individually and combined, were studied at physiological pH by DPP and CD spectroscopy. Whereas cadmium is a toxic metal ion of some concern, zinc is considered to be a "proantioxidant" [28] restricted to a narrow range of physiological concentrations. Diselenides such as SeCyst release zinc from zinc finger structures, which are frequently found in DNA binding proteins such as transcription factors and DNA repair proteins [28].

Finally, mixtures of SeCyst and reduced L-glutathione (GSH) in the presence of Cd^{2+} at physiological pH were also studied by DPP. There is a profound relation between both chalcogenic peptides. In the selenium enzyme glutathione peroxidase, for example, peroxide oxidizes the selenol group of the active-site SeCys to the corresponding selenenic acid, which then oxidizes the thiol group of GSH to form glutathione disulfide [18].

Materials and methods

Chemicals and instrumentation

SeCyst, (*R*,*R*)-3,3′-diselenobis(2-aminopropionic acid), and GSH were acquired from Sigma-Aldrich (purity more than 98%). Stock solutions (1 mL, 1 mmol L^{-1}) were prepared daily. To ensure homogeneity, solutions were mixed at 2,000 rpm for 1 min using an Eppendorf Mixmate and/or sonicated for 5 min.

All other reagents were of analytical grade from Merck. Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} stock solutions (10 mmol L^{-1}) were prepared by dissolving the respective salts in water and were complexometrically standardized. Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) was used as a pH 7.4 buffer, and KNO_3 was used as a supporting electrolyte at 50 mmol L^{-1} to ensure the appropriate ionic strength. All solutions were prepared freshly with buffer deoxygenated by nitrogen.

Voltammetric measurements by DPP were performed using a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software also from Metrohm. The working, reference, and auxiliary electrodes were a static mercury drop electrode with a drop area of 0.9 mm^2, an Ag/AgCl, KCl (3 mol L^{-1}) electrode, and a glassy carbon electrode, respectively, all of them from Metrohm. Double-distilled mercury was used. Instrumental parameters for DPP experiments were a voltage step of 0.005 V, a pulse amplitude of 50 mV, a pulse duration of 0.05 s, a drop time of 1 s, and a sweep rate of 50 mV s^{-1}. Calorimetric measurements (ITC) were performed with a VP-ITC titration calorimeter (MicroCal, Northampton, MA, USA) and pH measurements were conducted with an Orion SA 720 pH meter. CD spectroscopy data were obtained by means of a JASCO J-810 spectropolarimeter. All the experiments were conducted at 25 °C and purified nitrogen was used for solution deaeration.

Voltammetric titrations

Complexometric titrations were performed by DPP at 50 mmol L^{-1} Tris (pH 7.4)–50 mmol L^{-1} KNO_3. In each case, 20 mL of 10^{-5} mol L^{-1} starting solution was placed in the voltammetric cell. After deaeration with pure N_2 for 20 min, initial differential pulse polarograms were recorded. Further, successive additions of 10^{-3} mol L^{-1} titrant solution were made and polarograms were again recorded. After each addition, the solutions were purged with N_2 and mechanically stirred for 1.5 min. Data were corrected for dilution effects.

Voltammetric data treatment

Voltammograms were smoothed, baseline-corrected, and converted into data matrices using home-written programs implemented in MATLAB®. Chemometric analysis of data was performed through several programs also implemented in MATLAB® (some of them are available at http://www.mcrals.info and http://www.ub.edu/dqaelc/programes_eng.html), following the general method described in previous articles [24–27]. Besides, the Gaussian peak adjustment (GPA) algorithm was used for the correction of the progressive potential shifts of some voltammetric signals that decrease the linearity of the data [27]. Further details are given in Flowchart 1 in the electronic supplementary material.

Circular dichroism spectroscopy

Solutions of different Cd^{2+}, Zn^{2+}, and/or SeCyst concentration ratios, in 5 mmol L^{-1} Tris–HCl buffer at pH 7.4 (2 mL), were scanned at room temperature. Data were collected at 0.1-nm intervals with a 100 nm min^{-1} scan speed, 1-nm bandwidth, and 4-s response from 400 to 200 nm; a cylindrical quartz cell with 10-mm light path was used. The CD intensities in the far-UV regions are expressed as molar residue ellipticities given in units of degrees centimeters squared per mole. Chemometric analysis of CD data was done through the multivariate curve resolution with alternating least squares (MCR-ALS) algorithm, which is also implemented in MATLAB®, following the general method described elsewhere [29]. Flowchart 2 in the electronic supplementary material presents a simple scheme of the data analysis.

Isothermal titration calorimetry

ITC measurements were conducted, at 25 °C, in single direct titration mode (metal in the syringe). For direct titrations, the SeCyst concentration in the cell was set between 0.2 and 0.45 mmol L^{-1} and the concentration of the metal in the syringe was set at 5 mmol L^{-1}. For a typical experiment, 7–10 μL of titrant was added to the cell solution, with intervals ranging from 180 to 300 s between injections to achieve complete equilibration. The heat of dilution, measured by the injection of titrant into the buffer solution, was subtracted for each titration to obtain the net

reaction heat value. At least three independent measurements were performed for each system in both modes, and the best-fit values were averaged and reported. The data are presented as the baseline-adjusted raw data and the integrated heat values as a function of metal-to-peptide ratio in the cell in the direct titration. Fitting of ITC experimental data to a theoretical titration curve by a nonlinear least squares algorithm (minimization of χ^2) was done using MicroCal Origin® (version 7.0), with ΔH (enthalpy change in kilocalories per mole), K_a (association constant in liters per mole) and n (number of binding sites), as adjustable parameters. The goodness of the fit using different models was estimated from the calculated χ^2 value. Thermodynamic parameters were calculated from the equation

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = -RT \ln K_a \quad (1)$$

where ΔG, ΔH, and ΔS are the changes in the Gibbs free energy, enthalpy, and entropy of binding, T is the absolute temperature (298 K in this work), and the gas constant $R = 1.98$ cal mol^{-1} K^{-1}.

Results and discussion

Calorimetric study

ITC was used to quantify the binding of divalent metal ions to SeCyst and estimate the respective stability constants. Figure 1a compares the thermograms of the titration of SeCyst with different M^{2+} ions (representative examples are shown in Fig. S1). The molar enthalpy change can be obtained from the total heat flow registered upon the injection of the titrant. It is a global property that also contains the contributions from secondary interactions and nonspecific effects involving the solvent and buffer protonation processes [30]. All these equilibria contribute to the experimentally determined K_a and ΔH values. To extract the absolute thermodynamic parameters (ΔG, ΔH, and ΔS), these processes should be taken into account [31]. In the present case, however, the behavior and the differences in the thermodynamic parameters for a series of different metals were studied in the same medium and at physiological pH, as happens in real situations considering the environment of a cell. Hence, the secondary processes are not considered by assuming that they are present in all the cases and have a minor contribution in the comparison among metals.

Titrations with Cd^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} produced curves that could be fit reasonably well to the *one set of sites* model, and the average best-fit values are summarized in Table 1. The data clearly demonstrate that one M^{n+} binds one SeCyst molecule, and the stable M(SeCyst) complex is formed under these conditions.

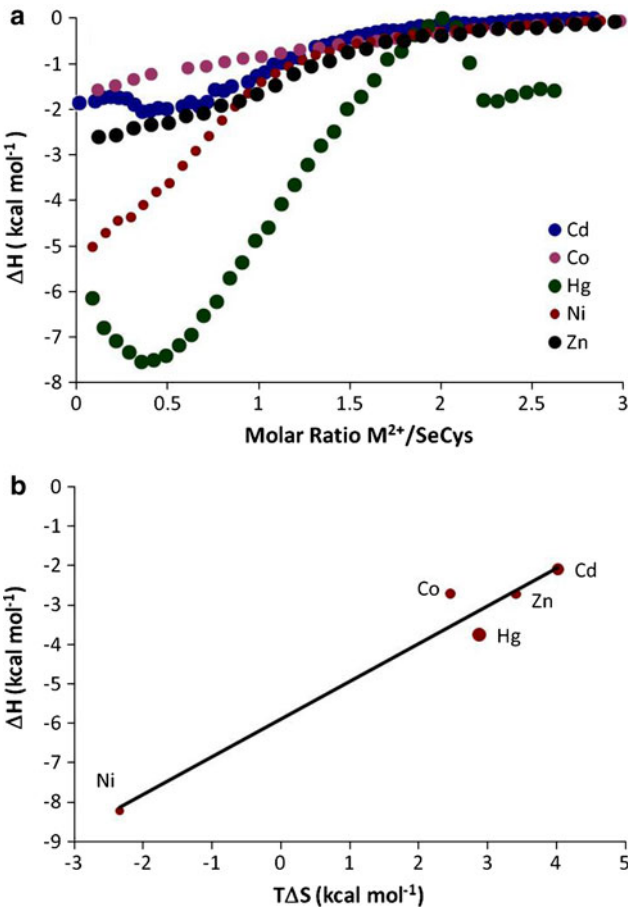


Fig. 1 **a** Comparison of isothermal titration calorimetry curves obtained in the M^{2+} titration of a 0.4 mmol L^{-1} selenocystine (SeCyst) solution at 25 °C in 50 mmol L^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethane (Tris) buffer–50 mmol L^{-1} KNO_3. **b** Relationship between ΔH and $T\Delta S$ for the binding of different metal ions to SeCyst

Different results were obtained for Hg^{2+}, where n (number of binding sites) was 1.5. Further fittings by either different binding models or fixing $n = 1$ did not yield satisfactory results. This suggests that other processes are affecting the ITC curve and the fitted parameters are merely tentative. Nevertheless, results obtained from voltammetric data, at a gold rotating disk electrode at low Hg^{2+} concentrations [32], have shown that the predominant species is the 1:1 Hg(SeCyst) complex, although a complex with a ratio of approximately 1.5 was also formed. This fact is consistent with the reported ITC data.

Peptides consist of polar groups that readily form hydrogen bonds with water molecules, whereas metal ions have favorable ion–dipole interactions with the dipolar water molecules, leading to the formation of hydration spheres around the metal ion. In addition, metal ions can displace protons when binding peptides, thus leading to buffer protonation, whereas water molecules are rearranged. Thus, the overall ΔH observed depends on all these combined equilibria.

Table 1 Thermodynamic parameters for M^{2+} titration of a 0.4 mmol L^{-1} selenocystine (*SeCyst*) solution at 25 °C in 50 mmol L^{-1} tris(hydroxymethyl)aminomethane buffer–50 mmol L^{-1} KNO_3

System M^{2+}(SeCyst)	*n*	10^3 K_{ITC} (M^{-1})	ΔG (kcal mol^{-1})	ΔH (kcal mol^{-1})	$T\Delta S$ (kcal mol^{-1})
Hg	1.5 (0.1)	70.95 (4.03)	−6.63 (0.01)	−3.75 (0.01)	2.88 (0.07)
Cd	1.2 (0.1)	32.80 (2.47)	−6.11 (0.03)	−2.09 (0.01)	4.02 (0.34)
Zn	1.2 (0.1)	31.85 (2.74)	−6.14 (0.06)	−2.73 (0.02)	3.41 (0.23)
Ni	0.8 (0.1)	19.75 (5.16)	−5.87 (0.02)	−8.21 (0.96)	−2.35 (0.69)
Co	0.8 (0.1)	6.22 (0.91)	−5.17 (0.08)	−2.71 (0.01)	2.46 (0.09)

The relative standard deviations of *n* values obtained from several replicates are in parentheses

ITC isothermal titration calorimetry

Diselenide bond breakage can also be induced by metal binding, but it is usually a slow kinetic process and can be disregarded on the timescale of the measurements. Besides, such a process would involve the formation of a second metal complex, with one metal ion disrupting the Se–Se bond and yielding an Se–M–Se bridge. The second metal ion would be bound to the available negatively charged carboxylic groups, thus yielding an M_2L complex, or in the case where the metal has great affinity towards selenium, two ML complexes (with L being the monomer). In the absence of more structural information, but discarding the unlikely diselenide breakage throughout complexation in solution and with the known stoichiometric value of $n = 1$, metal coordination should occur mainly with the terminal carboxylate group and, in some cases, with the deprotonated amine groups.

In all the cases studied, the ITC curves showed exothermic profiles (Table 1). Enthalpic and entropic contribution to the free energy of binding can be analyzed, and the data reveal that for Hg^{2+}, Cd^{2+}, Zn^{2+}, and Co^{2+} the processes are both enthalpically driven and entropically driven, which can be attributed to the formation of strong polar interactions together with the release of solvent molecules as a result of the above-mentioned dehydration (ion-pair exchange). However, titrations with Ni^{2+} showed different profiles. Although they are exothermic, the entropic change is unfavorable.

The order of the binding constant for the metal ions is $Hg^{2+} > Cd^{2+} \sim Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$ (Table 1). Although the free-energy values differ only slightly for the interaction between SeCyst and the metal ions studied, the corresponding enthalpy values differ over a relatively large range (Table 1). This gives a strong indication of the so-called entropy–enthalpy compensation accompanying these processes. Accordingly, a plot of ΔH versus ΔS yields a linear relationship (Fig. 1b), which means this phenomenon resembles those frequently found in nature [33, 34]. Larger compensated values are observed for participating metal ions with smaller ionic radii. This associated entropy increase could arise from the greater perturbation of the solvation shells of the smaller metal ions (higher charge density compared with larger metal ions) and conformational changes of the selenopeptide associated with the binding of smaller metal ions. However, as the exact origin of the entropy and enthalpy components of the interaction between SeCyst and these metal ions is unknown, our proposed explanation is mere speculation based on an analogy with the documented behavior of metal-binding Cys-related peptides [30, 35, 36].

Competitive binding

To follow the behavior of SeCyst in competitive complex systems, we selected two model cases: (1) competitive binding of Zn^{2+} and Cd^{2+} towards SeCyst and (2) competitive binding of SeCyst and GSH towards Cd^{2+}.

Metal competitive binding of Zn^{2+} and Cd^{2+} by SeCyst was examined by the titration of an equimolar solution of Cd^{2+}(SeCyst), at pH 7.4, with Zn^{2+} (Fig. 2a). Individual titrations of SeCyst with Cd^{2+} and Zn^{2+} ions were performed for control purposes (shown in Fig. S2). The conditional stability constants of metal complexes can be roughly estimated from voltammetric data (DPP) by the Nernst equation (see the electronic supplementary material for further details). In Tris buffer, for the Cd(SeCyst) complex, K_{DPP} (3.77×10^5) is 1 order of magnitude greater than K_{ITC} (3.28×10^4, Table 1). For the Zn(SeCyst) complex, both values are similar ($K_{DPP} = 4.18 \times 10^4$ and $K_{ITC} = 3.18 \times 10^4$, Table 1).

In the initial voltammogram, a reduction peak corresponding to Cd(SeCyst) (at −0.78 V; component 3) and the corresponding anodic signal of mercury (at $E <$ −0.50 V) are observed. These types of signals are particular phenomena of the electrode material. A brief explanation of the characteristic of mercury anodic signal is given in the electronic supplementary material. The successive addition of Zn^{2+} produced a progressive decrease of the main signal simultaneously with the appearance and increase of the peak corresponding to Zn^{2+} and the Zn(SeCyst) complex (partially overlapped at $E > -1.0$ V).

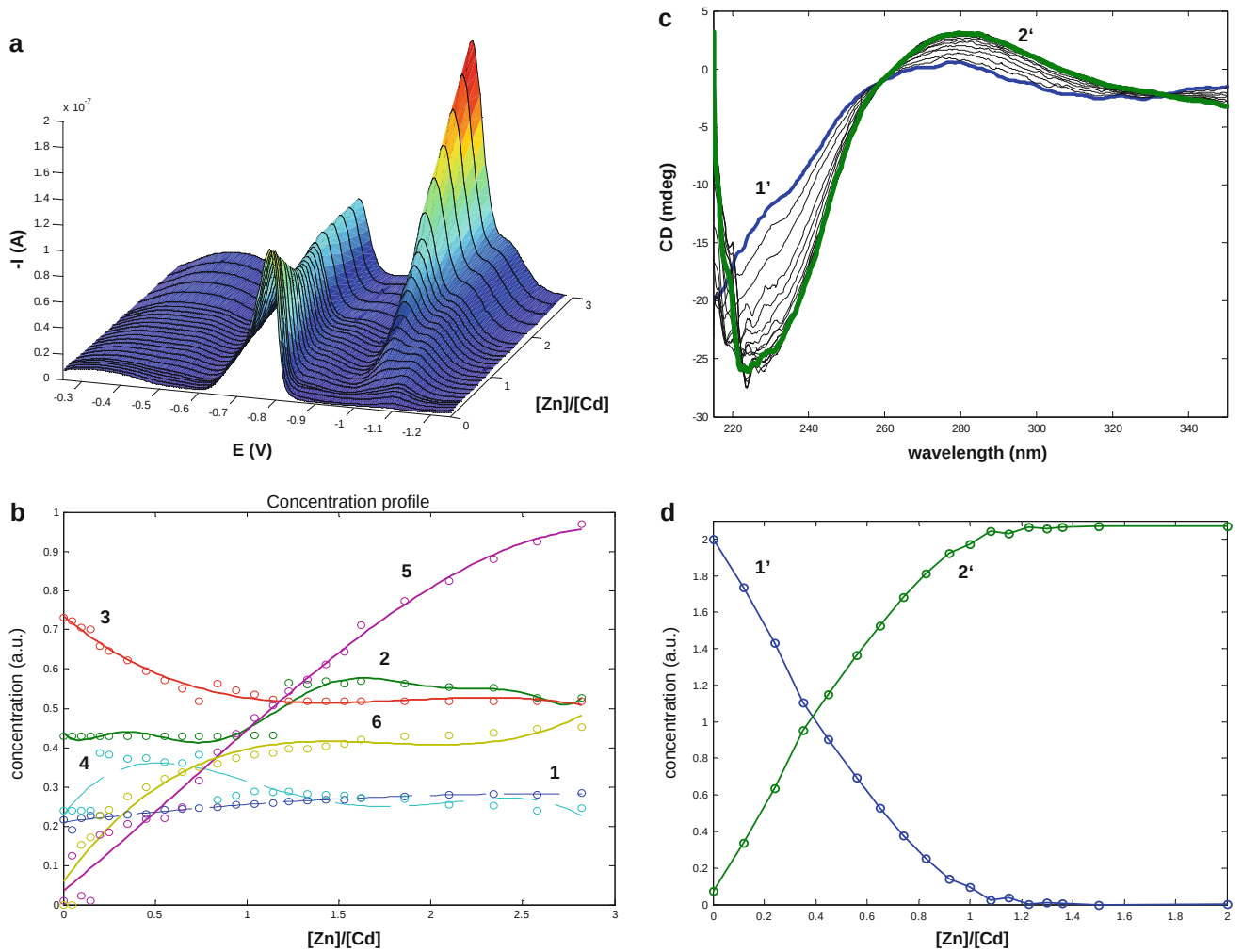


Fig. 2 **a** Evolution of differential pulse polarography (DPP) curves (current vs. potential vs. concentration ratio) with Zn^{2+} additions to a 10 μmol L^{-1} Cd(SeCyst) solution, in 50 mmol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer at pH 7.4, and **b** Concentration profiles obtained upon the application of the Gaussian peak adjustment (GPA) method with 6.93% lack of fit (LOF). The axes are arranged for a better perspective of signal evolution. The concentration profiles are plotted as a function of the added Zn^{2+}-to-Cd^{2+} concentration ratios. The components are as follows: *1* anodic signal of Hg in the presence of Cd complexes; *2* Cd^{2+} reduction in the SeCyst mixed-metal complex; *3* Cd(SeCyst) complex; *4* anodic signal of Hg in the presence of Zn complexes; *5* free Zn^{2+}; *6* Zn(SeCyst) complex. **c** Circular dichroism (*CD*) spectra obtained in the titration of an equimolar 100 μmol L^{-1} Cd(SeCyst) solution with Zn^{2+} in 10 mM Tris–HCl buffer at pH 7.4 and **d** concentration profiles obtained by the multivariate curve resolution with alternating least squares method (with constraint of nonnegativity for concentration) with 2.49% LOF. Initial estimates of components *1′*—Cd(SeCys) complex—and *2′*—Cd(SeCys)Zn complex—are shown in *bold*

In the concentration profiles obtained by the GPA method (Fig. 2b; lack of fit 6.93%), the free Zn^{2+} reduction (component 5, at $E = -1.01$ V) increases from the first additions, indicating a weak binding with SeCyst. The reduction signal of Zn^{2+} bound to SeCyst (component 6, at $E = -1.11$ V, in Fig. 2b) is increasing until a 1:1 zinc-to cadmium ratio is attained, and then it remains stable as in the individual titration of SeCyst with Zn^{2+}. Moreover, Zn^{2+} does not displace Cd^{2+}, because of the absence of a free Cd^{2+} reduction signal, although it causes some destabilization of the complex, as shown by both the progressive signal decrease and shifts to more positive potentials of Cd^{2+} bound to SeCyst (component 3, at $E = -0.79$ V). This suggests the formation of a ternary Zn(SeCyst)Cd complex (component 2, at $E = -0.73$ V) where Cd^{2+} is more weakly bound.

This statement is supported by CD evidence, which has been widely used in metal–thiol studies [29, 37, 38] to complement and clarify results obtained by electrochemical means [26, 29]. Moreover, CD spectroscopy can be applied to relatively dilute solutions, like those used in voltammetry, with the advantage that spectroscopic measurements are based on totally different principles (absence of voltammetric anodic signals due to Hg). Owing to the

nature of electrochemical measurements, it is important to note that the concept of "component" in GPA refers to the signal from an electrochemical process, and not to a chemical species, as in spectroscopic data. For instance, in the complexes containing two different electroactive sites (e.g., two metal ions reducing at different potentials), two components (i.e., electrochemical processes) may be associated with one unique chemical species. These considerations play a key role in further interpretation of chemometric results.

In the CD data, the signals of the Cd(SeCyst) complex (component 1′, Fig. 2c) undergo redshifts until a 1:1 zinc-to cadmium ratio is attained. This behavior, supported by DPP results, suggests the presence of two CD-active components. The second component considered here is the mixed Zn(SeCyst)Cd complex (component 2′, Fig. 2c). MCR-ALS yields satisfactory results with two components, with a lack of fit of 2.45%. Figure 2d confirms that the mixed-metal complex is formed from the beginning of the titration (component 2′) and stabilizes at an equimolar zinc-to-cadmium ratio, which coincides with the ratio observed by DPP (Fig. 2b).

These results are consistent with those from the reverse DPP titration, i.e., additions of Cd^{2+} to an equimolar Zn(SeCyst) solution (Fig. S4). Initially Cd^{2+} is bound to SeCyst, which stabilizes at approximately 1:1 zinc-to-cadmium ratio and then free Cd^{2+} appears. Minimal displacement of Zn^{2+} and a decrease in Zn(SeCyst) signals are observed.

In the second competitive binding situation, the properties of the diselenide bond are analyzed and compared with those of a biologically important thiol that is of particular interest. For this purpose, the ubiquitous tripeptide GSH (γGlu-Cys-Gly) was selected; γGlu designates an amide linkage between the side chain of glutamate and the amino group of Cys.

Although, it is described in literature that GSH can reduce SeCyst to SeCys [39], no interactions between GSH and SeCyst were observed under the present experimental conditions, and a clear separation of the respective anodic peaks was observed (curves not shown). When SeCyst was added to a 1:2 Cd^{2+}-to-GSH solution, a decrease of the Cd(GSH) signals, combined with the appearance of a shoulder at more negative potentials, was observed (Fig. 3a). With further SeCyst additions, this shoulder developed into a very well defined signal. Simultaneously, an increase of the anodic oxidation of mercury signal at less negative potentials took place. In this case, SeCyst displaced GSH from its Cd^{2+} complexes, mainly $Cd(GSH)_2$ [23], yielding more stable complexes. The best GPA analysis of this data matrix provides the concentration profiles (Fig. 3b; 6.29% lack of fit) showing that component 3 [Cd(GSH) complex, at −0.65 V] suffers a drastic decrease from the first addition of SeCyst, and reaches a minimum at SeCyst-to-Cd^{2+} ratios of approximately 1.0. This indicates the complete substitution of GSH by SeCyst in the complex. In parallel to this, component 5 [Cd(SeCyst) complex, at −0.79 V] rises continuously. Analogous increases in component 2 (anodic signal due to GSH at −0.51 V) from a ratio of 0.5 and in component 4 (anodic signal of SeCyst in excess at −0.68 V) from a ratio of 1.5 were also observed, due to the evolution of both uncomplexed ligands.

This behavior suggests that no mixed-ligand complexes are formed. As in metal/Cys-rich peptide competing systems [25], the results showed that longer-chain peptides, or those with more binding sites, easily displace shorter peptides from their metal complexes. Furthermore, equilibrium

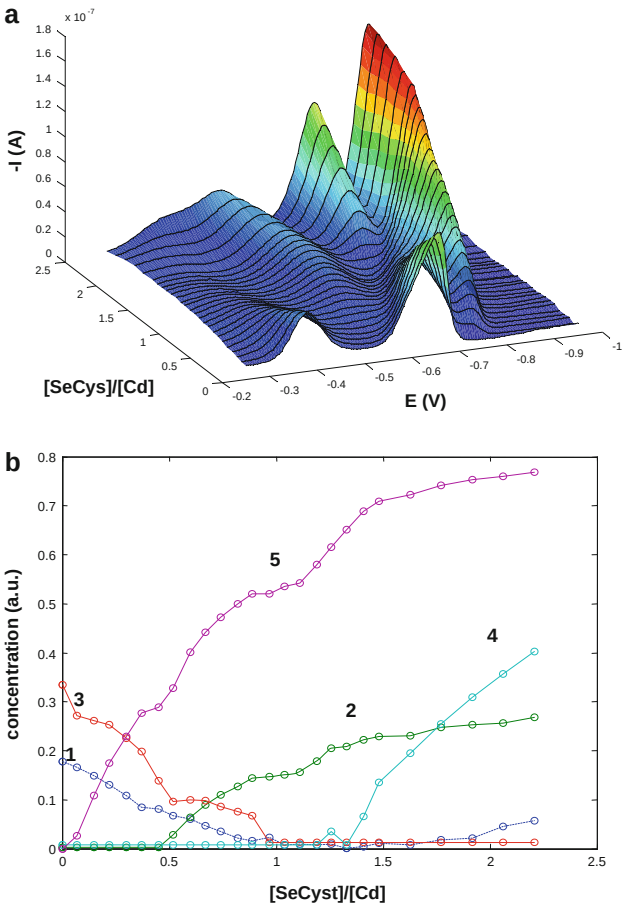


Fig. 3 **a** Evolution of DPP curves (current vs. potential vs. concentration ratio) with SeCyst additions to a 10 μmol L^{-1} Cd–reduced L-glutathione (GSH) solution, in 50 mmol L^{-1} Tris–HNO_3 buffer at pH 7.4, and **b** concentration profiles obtained upon the application of the GPA method, with 6.29% LOF. The axes are arranged for a better perspective of signal evolution. The concentration profiles are plotted as function of the added GSH-to-Cd^{2+} concentration ratios. The components are as follows: *1* anodic signal of Hg in the presence of Cd complexes; *2* free GSH; *3* Cd(GSH) complex; *4* SeCyst in excess; *5* Cd(SeCyst) complex

is reached within the few minutes taken for every addition followed by solution stirring. Despite the fact that the systems were deliberately chosen to favor the formation of mixed-ligand complexes to easily fulfill Cd^{2+} tetrahedral coordination, no voltammetric evidence of such species was found. Taking into account such results, future work should involve a more exhaustive investigation of the role of the diselenide and thiol ligands in metal binding systems, especially concerning the competition between both.

Conclusion

We presented a proposal for a relatively new method as a complement to the more usual methods used in studies of metal-binding selenopeptides. The combined use of ITC, CD spectroscopy, and voltammetry (through DPP mode) assisted by some very recently developed chemometric methods, as GPA, allowed us to investigate the metal-binding properties of SeCyst at physiological pH. Calorimetric titrations of SeCyst with Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} produced curves reasonably well fitted by the *one set of sites* model for the formation of stable 1:1 M(SeCyst) complexes. The exception seems to be the case of mercury, because other processes are present that affect the ITC curve and, as a consequence, the fitted parameters are merely tentative. The order of the SeCyst binding constant for metal ions is $Hg^{2+} > Cd^{2+} \sim Zn^{2+} > Ni^{2+} > Co^{2+}$.

If we compare K_{ITC} and K_{DPP} (estimated values) for the binding of Cd^{2+} and Zn^{2+}, the DPP values are greater than the ITC values. It must be clearly remarked that the DPP values are overestimations, since the parameter used (ΔE; see the electronic supplementary material for further details) has not only a thermodynamic component but also a kinetic contribution of the usually irreversible metal complex reduction. Moreover, the kinetic contribution of Cd^{2+} complexes is possibly much higher than that of Zn^{2+} complexes, thus enhancing the K_{DPP} estimate for Cd^{2+} complexes.

The behavior of SeCyst in competitive systems was studied through two model cases: (1) competitive binding of Zn^{2+} and Cd^{2+} towards SeCyst and (2) competitive binding of SeCyst and GSH towards Cd^{2+}. The comparison of the properties of the diselenide bond with those of a biologically important thiol as GSH is particularly interesting.

In the first case, the presence of two CD-active components, supported by DPP results, allows us to propose the formation of the mixed ZnCd(SeCyst) complex. In the second case, no interactions between GSH and SeCyst were observed, as separation of the respective electrochemical peaks showed. When SeCyst was added to Cd:GSH system, SeCyst displaced GSH from its Cd^{2+} complexes, mainly $Cd(GSH)_2$, yielding more stable complexes. Moreover, electrochemical data suggested that no mixed-ligand complexes are formed. The combined use of several techniques based on totally different principles allowed us to obtain a detailed picture of the systems studied.

Acknowledgments The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471). R.G. is grateful to MICINN for his PhD grant (BES-2007-15385).

References

1. Battin EE, Brumaghim JL (2009) Cell Biochem Biophys 55:1–23
2. Jacob C, Giles GI, Giles NM, Sies H (2003) Angew Chem Int Ed 42:4742–4758
3. Jamier V, Ba LA, Jacob C (2010) Chem Eur J 16:10920–10928
4. Ramoutar RR, Brumaghim JL (2010) Cell Biochem Biophys 58:1–23
5. Stadtman TC (1990) Annu Rev Biochem 59:111–128
6. Stadtman TC (1996) Annu Rev Biochem 65:83–100
7. Axley MJ, Boeck A, Stadtman TC (1991) Proc Natl Acad Sci USA 88:8450–8454
8. Berry MJ, Kieffer JD, Harney JW, Larsen PR (1991) J Biol Chem 266:14155–14158
9. Huber RE, Criddle RS (1967) Arch Biochem Biophys 122:164–173
10. Singh R, Whitesides GM (1991) J Org Chem 56:6931–6933
11. Nauser T, Dockheer S, Kissner R, Koppenol WH (2006) Biochemistry 45:6038–6043
12. Moroder L (2005) J Pept Sci 11:187–214
13. Steinmann D, Nauser T, Koppenol WH (2010) J Org Chem 75:6696–6699
14. Beld J, Woycechowsky KJ, Hilvert D (2007) Biochemistry 46:5382–5390
15. Mobli M, de Araújo AD, Lambert LK, Pierens GK, Windley MJ, Nicholson GM, Alewood PF, King GF (2009) Angew Chem Int Ed 48:9312–9314
16. Battin EE, Perron NR, Brumaghim JL (2005) Inorg Chem 45:499–501
17. Mukherjee AJ, Zade SS, Singh HB, Sunoj RB (2010) Chem Rev 110:4357–4416
18. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK (2007) Antioxid Redox Signal 9:775–806
19. Sasakura C, Suzuki KT (1998) J Inorg Biochem 71:159–162
20. Suzuki KT, Sasakura C, Yoneda S (1998) Biochem Biophys Acta 1429:102–112
21. Bai Y, Wang T, Liu Y, Zheng W (2009) Colloids Surf. B 74:150–153
22. Lim JK, Joo S-W (2007) J Electroanal Chem 605:68–72
23. Bai Y, Wang YD, Zheng WJ, Chen YS (2008) Colloids Surf. B 63:110–115
24. Esteban M, Ariño C, Díaz-Cruz JM (2006) Trends Anal Chem 25:86–92
25. Gusmão R, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2010) Anal Biochem 406:61–69
26. Gusmão R, Cavanillas S, Ariño C, Diaz-Cruz JM, Esteban M (2010) Anal Chem 82:9006–9013
27. Cavanillas S, Díaz Cruz JM, Ariño C, Esteban M (2011) Anal Chim Acta 689:198–205

28. Maret W (2006) Antioxid Redox Signal 8:1419–1441
29. Alberich A, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2007) Anal Chim Acta 584:403–409
30. Grossoehme N, Spuches A, Wilcox DE (2010) J Biol Inorg Chem 15:1183–1191
31. Wilcox DE (2008) Inorg Chim Acta 361:857–867
32. Gilsanz C, Gusmão R, Chekmeneva E, Serrano N, Ariño C, Díaz-Cruz JM, Esteban M (2011) Electrochim Acta 56:5988–5992
33. Benzinger TH (1971) Nature 229:100–102
34. Liu L, Guo Q-X (2001) Chem Rev 101:73–696
35. Chekmeneva E, Diaz-Cruz JM, Ariño C, Esteban M (2009) Environ Sci Technol 43:7010–7015
36. Mehra RK, Miclat J, Kodati VR, Abdullah R, Hunter TC, Mulchandani P (1996) Biochem J 314:73–82
37. Orihuela R, Monteiro F, Pagani A, Capdevila M, Atrian S (2010) Chem Eur J 16:12363–12372
38. Torreggiani A, Domènech J, Orihuela R, Ferreri C, Atrian S, Capdevila M, Chatgilialoglu C (2009) Chem Eur J 15:6015–6024
39. Dickson RC, Tappel AL (1969) Arch Biochem Biophys 130:547–550

Supplementary Material

Combination of chemometrically-assisted voltammetry, calorimetry and circular dichroism as a new methodology for the study of bioinorganic substances. Application to selenocystine metal complexes.

Rui Gusmão, Rafel Prohens, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz and Miquel Esteban*

Departament de Química Analítica. Facultat de Química. Universitat de Barcelona

Martí i Franquès 1 - 11, E - 08028 - Barcelona (Spain)

Phone: (+34) 93 402 15 45. Fax: (+34) 93 402 12 33.

*to whom correspondence should be addressed

S1. Isothermal Titration Calorimetry

S2. Voltammetric Individual Complexing Studies

S3. Voltammetric Competitive Complexing Studies

S4. Data Treatment

S5. Anodic Signals of Mercury Electrodes

S1. Isothermal Titration Calorimetry

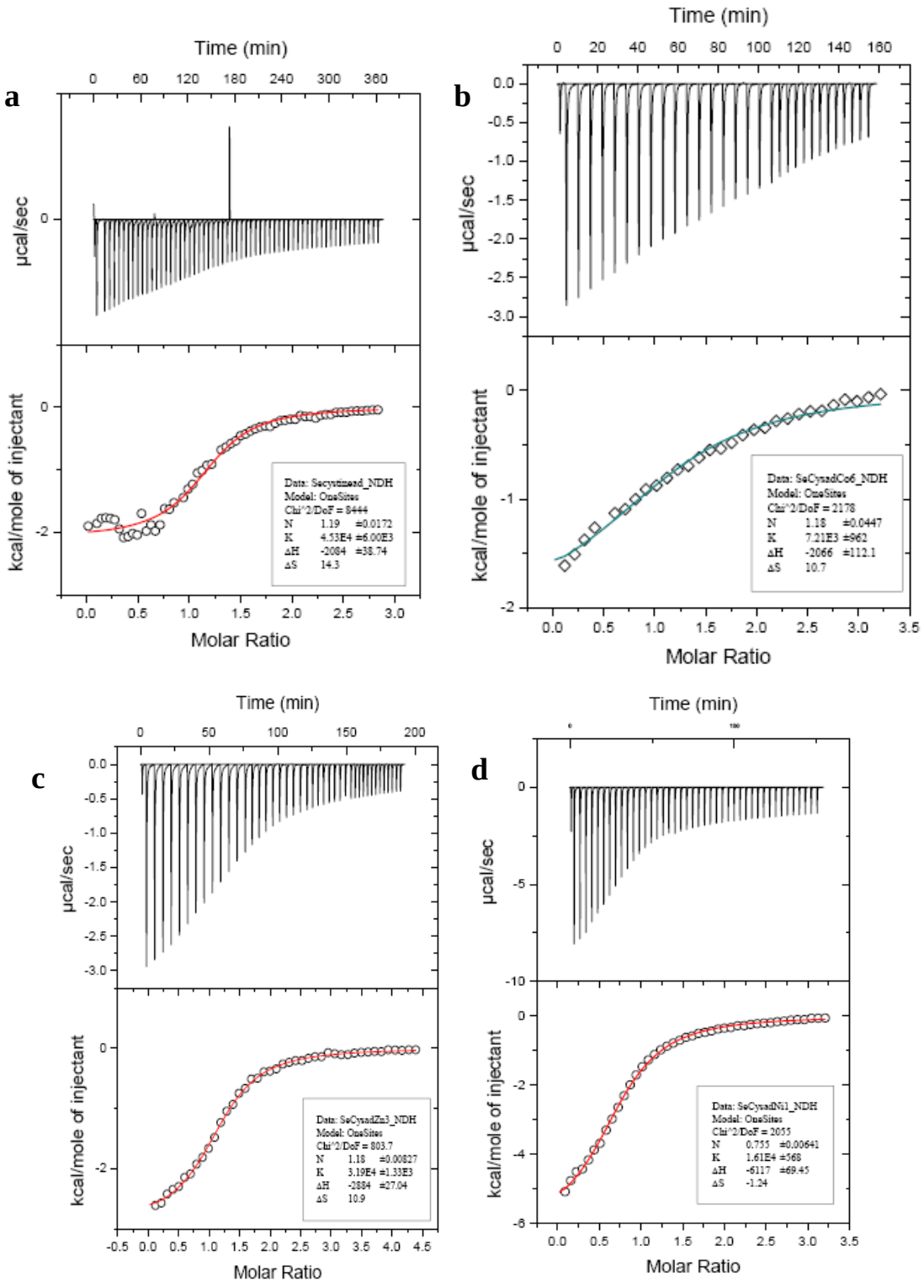


Figure S1 - Examples of ITC curves obtained for titrations of 0.4 mmol L^{-1} SeCyst solution with M^{2+}, at 25ºC in 50 mmol L^{-1} TRIS buffer – 50 mmol L^{-1} KNO_3: (a) Cd, (b) Co, (c) Ni and (d) Zn.

S2. Voltammetric Individual Complexing Studies

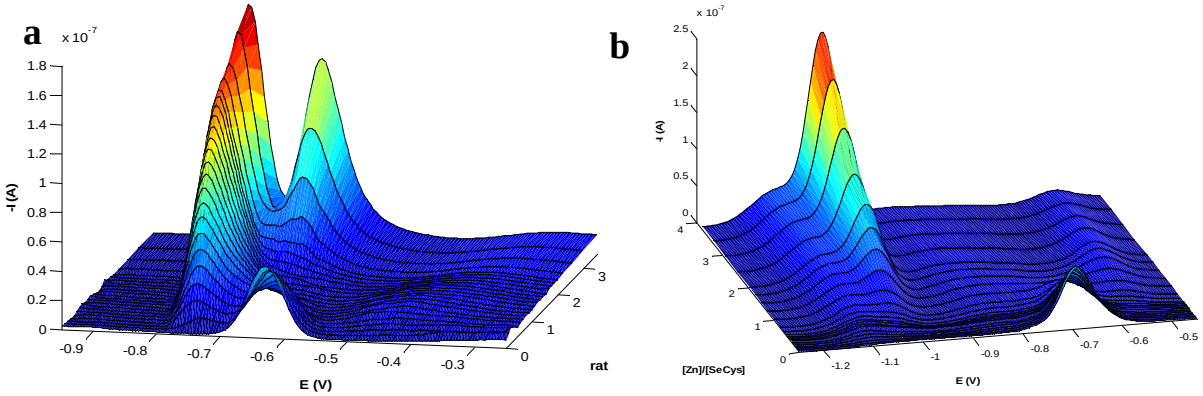


Figure S2 – Voltammetric curves obtained in the titration of 10 µM SeCys solution, in 50 mmol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer at 7.4, by Cd^{2+} (a) and Zn^{2+} (b). Axes are disposed for a better perspective of signals evolution.

S3. Voltammetric Competitive Complexing Studies

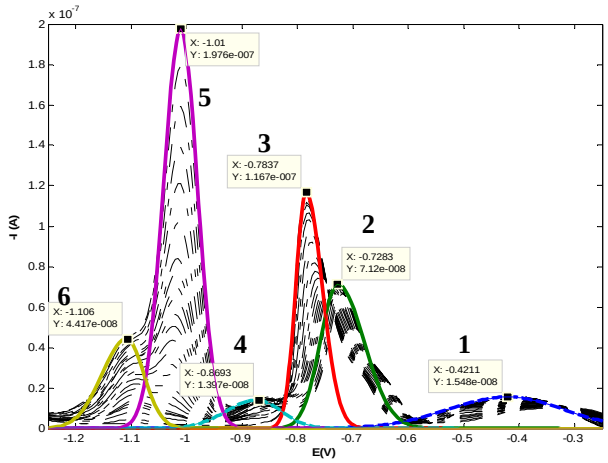


Figure S3 – Initial estimation of components for the chemometrical treatment (GPA method) of the data matrix obtained in the titration of a Cd^{2+}:SeCyst solution with Zn^{2+} (shown in Figure 6a), in 50 mmol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer at pH 7.4. Components are: 1- anodic signal of Hg in the presence of Cd^{2+}-complexes; 2- reduction of Cd^{2+} in the SeCyst mixed metal complex; 3- reduction of Cd^{2+} in Cd(SeCyst); 4- anodic signal of Hg in the presence of Zn^{2+}-complexes; 5- reduction of free Zn^{2+}; 6- reduction of Zn^{2+} in the Zn(SeCyst) complex. For each component a label is shown with the reference potential.

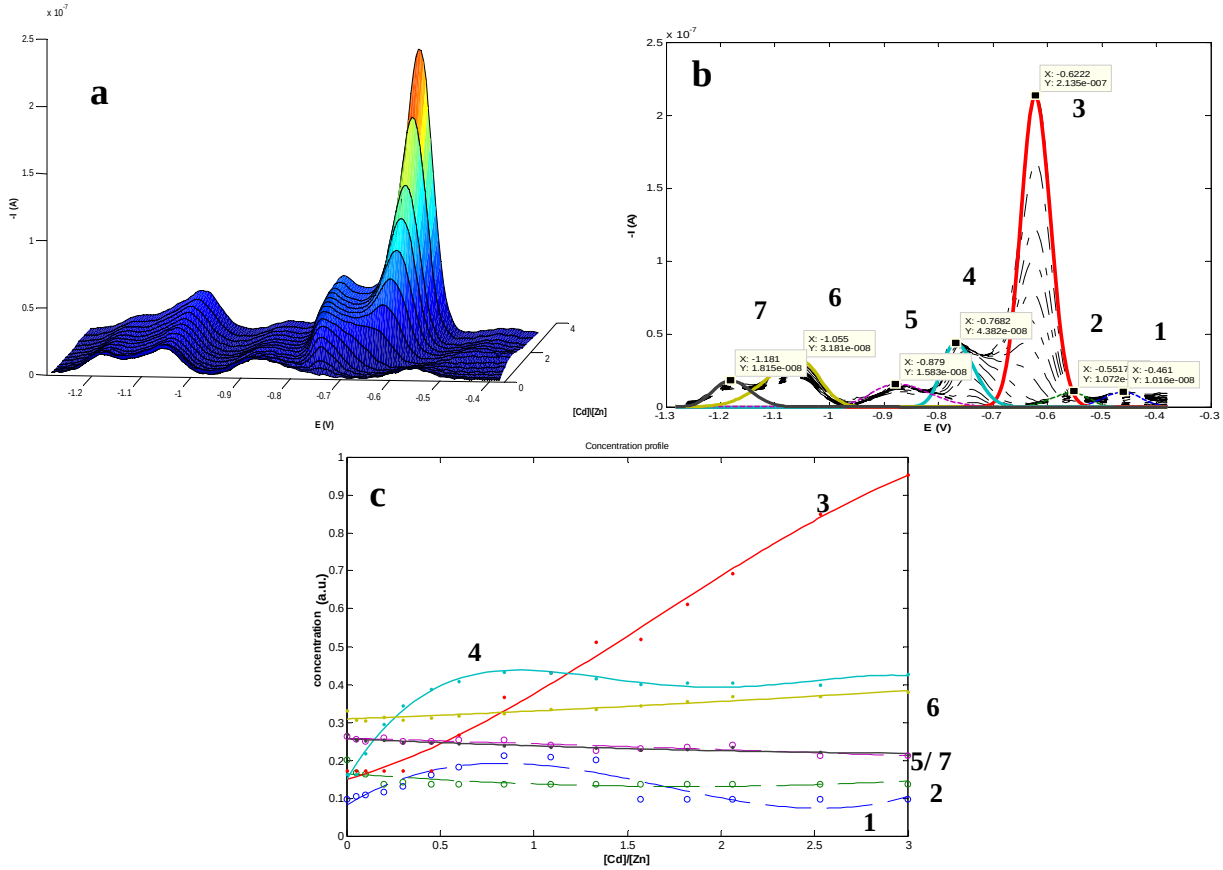


Figure S4 – (a) Voltammetric curves obtained in the titration of a Zn:SeCyst solution with Cd^{2+}, in 50 mmol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer at pH 7.4. (b) Initial estimation of components for the analysis of the data matrix from a). Concentration profiles obtained by GPA analysis of data matrix from a). Components are: 1- anodic signal of Hg in the presence of Cd^{2+} complexes; 2- Cd^{2+} reduction in SeCyst mixed metal complex; 3- reduction of Cd^{2+} in (SeCyst); 4- anodic signal of Hg in the presence of Zn complexes; 5- reduction of free Zn^{2+}; 6- reduction of Zn^{2+}in Zn(SeCyst) complex. For each component a label is shown with the reference potential.

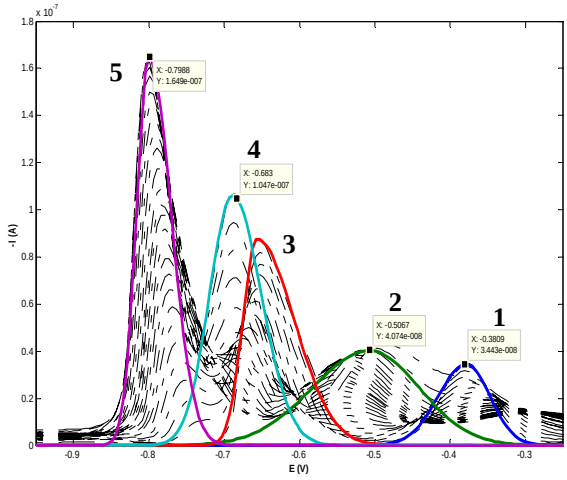
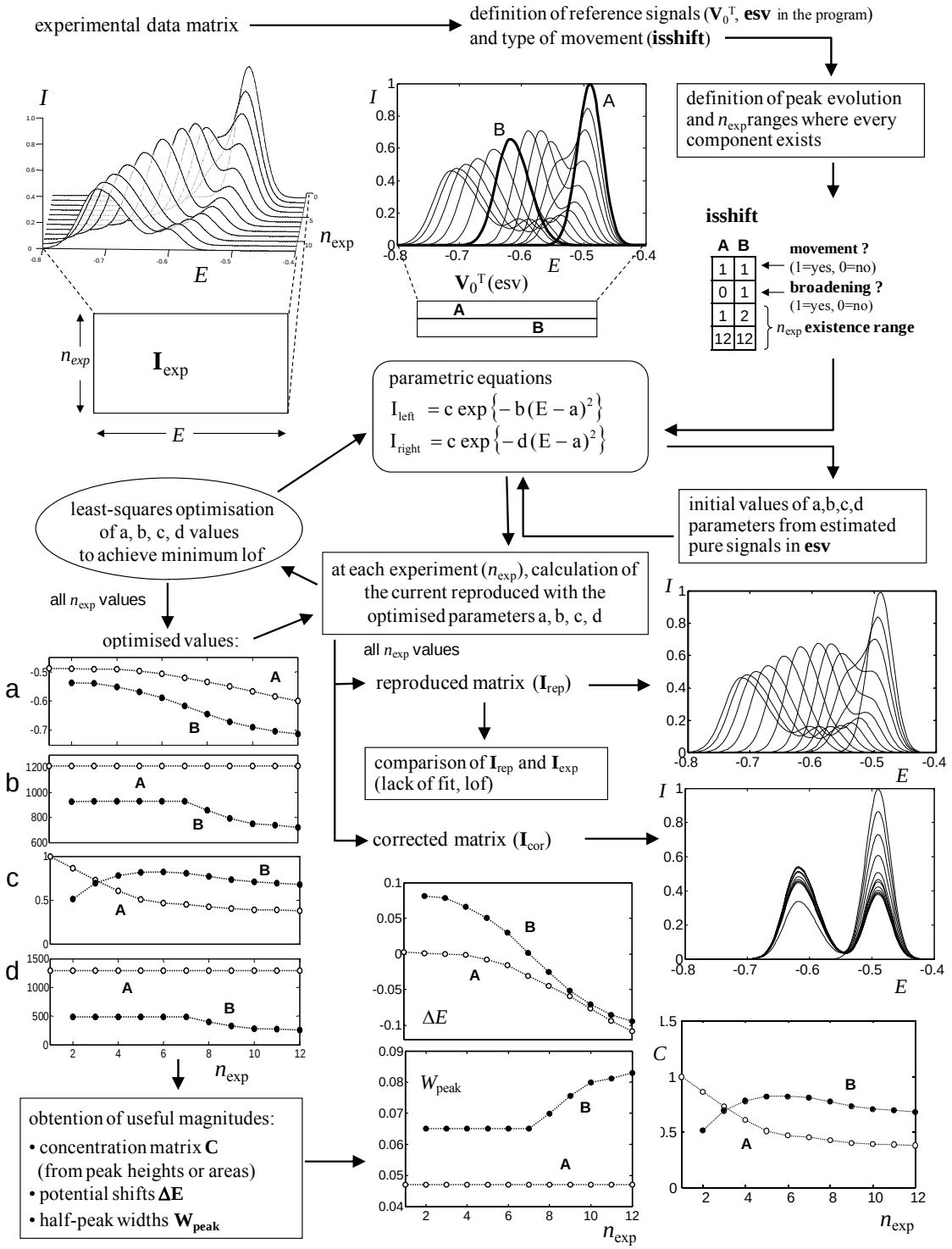
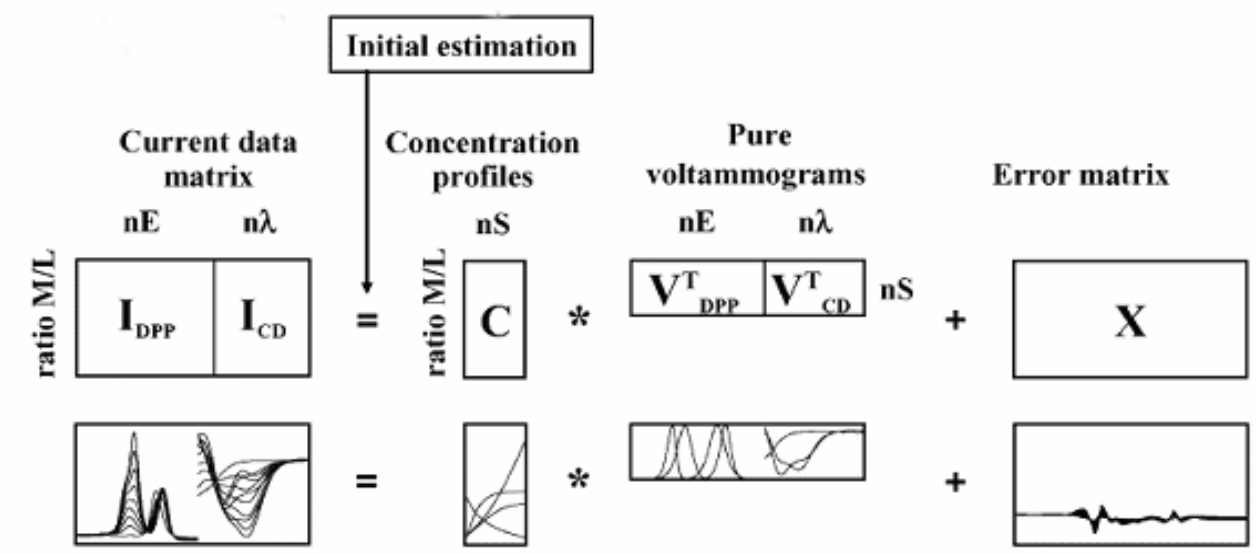


Figure S5 – Initial estimation of components for the chemometrical treatment (GPA method) of the data matrix obtained in the titration of a 2:1 (10 µmol L^{-1}) Cd : GSH solution with SeCyst (shown in Figure 6c), in 50 mmol L^{-1} TRIS-HNO_3 buffer at pH 7.4. Components are: 1- anodic signal of Hg in the presence of Cd^{2+}-complexes; 2- anodic signal of GSH; 3- reduction of Cd^{2+} in Cd(GSH); 4- anodic signal of SeCyst; 5- reduction of Cd^{2+} in the Cd(SeCyst) complex. For each component a label is shown with the reference potential.

S5. Data Treatment



Flowchart 1 - Methodology for non-linear multivariate curve resolution analysis of a voltammetric titration dataset by means of GPA programs, as seen in Reference 25.



Flowchart 2 - Simultaneous MCR-ALS analysis of an augmented matrix obtained by the proposed combination of voltammetric and spectroscopic experiments adapted from Reference 37.

Estimation of stability constants from signal potential

The binding between M^{2+} and SeCyst occurs mainly through carboxyl group, yielding kinetically inert but electroactive complexes with well-defined signals, whose evolution can be used to roughly estimate equilibrium parameters.

A possible approach is based on the differences between the reduction peak potentials of unitary voltammograms. They can be related to conditional equilibrium constant K' through the Nernst equation, written in the form of electrode potentials. Thus, for electrochemical half-reactions of the type (at 25ºC):

$$M + 2e^- \rightarrow M(Hg) \quad (1)$$

$$ML + 2H^+ + 2e^- \rightarrow M(Hg) + H_2L \quad (2)$$

$$\Delta E = E_2^{0\,\prime} - E_1^{0\,\prime} \quad (3)$$

$$\log K' = \frac{nF}{RT}\left|\Delta E\right| \quad (4)$$

Where $E_1^{0\,\prime}$ and $E_2^{0\,\prime}$ are the formal potentials of process (1) and (2) respectively, which can be estimated from the corresponding peak potentials. Indeed, this is an overestimation of the stability constant, since ΔE has not only a thermodynamic component but also a kinetic contribution of the usually irreversible metal complex reduction.

S5. Anodic Signals of Mercury Electrodes

As a consequence of the great affinity of thiol/selenide compounds towards mercury, the use of mercury electrodes involves the formation of mercurous and mercuric thiolates/selonates that are both strongly adsorbed on the electrode. Considering the similarity of S- and Se-ligands, several anodic signals are usually obtained in the voltammetric study of metal-thiolate systems. This causes additional difficulties when they overlap with the characteristic signals of the considered species, although in some cases they allow us to follow the evolution of free thiolate groups.

Special mention deserves the anodic signals caused by thiol-containing peptides. Thus, for instance, a cysteine mercurous thiolate $Hg_2(SR)_2$, is formed in cysteine solutions near the electrode surface in the potential range of the anodic wave/peak of cysteine, according to the processes:

$$2Hg^0 \rightleftharpoons Hg_2^{2+} + 2e^- \quad (5)$$

$$2RS^- + Hg_2^{2+} + ne^- \rightleftharpoons Hg_2(SR)_2 \quad (6)$$

Mercurous glutathione thiolate and other mercury thiolates can be formed in a similar way. In some cases the formation of Hg(I) and Hg(II) complexes is proposed. Then, in the case of GSH or its fragments, if the potential previous to the DPP pulse is sufficiently positive to produce the oxidation of mercury to thiolates, when a reducing potential pulse is applied, two kinds of signals can be observed corresponding to the processes:

$$\text{Hg-peptide} + mH^+ + ne^- \rightleftharpoons Hg^0 + \text{peptide (protonated} \quad (5)$$

$$\text{Hg-peptide} + M^{2+} + ne^- \rightleftharpoons Hg^0 + M^{2+}\text{-peptide} \quad (6)$$

i.e., the reduction of mercury favoured by protonation of the peptide or by displacement of the mercury ion by a heavy metal ion M present in solution. The main difference among both processes is that the peak potential of the first type of signals is much more pH-dependent than that of the second type.

8.4 Discusión de resultados

El uso de la voltamperometría (8.2), a través del modo DPP, asistido por GPA y *pHfit*, nos ha permitido investigar las propiedades de complejación metálica de la SeCyst dentro de un amplio intervalo de pH. No se encontraron evidencias electroquímicas para la formación de complejos metálicos con Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} y Pb^{2+}. En contraste, SeCyst forma complejos electroinactivos con Co^{2+} y Ni^{2+}, y cinéticamente inertes y electroactivos con Cd^{2+} y Zn^{2+}.

Como se mencionó antes, el conjunto de datos se analizó mediante los algoritmos *pHfit* y GPA, y los resultados correspondientes se resumen en la Tabla 1 del trabajo 8.2. El valor de *lof* es considerablemente mayor para los resultados con *pHfit* porque, al revés de GPA, este algoritmo no ajusta las anchuras de los picos, ya que supone que son constantes. Sin duda, este parámetro, para la mayoría de los picos, cambia a lo largo de las valoraciones de pH. El movimiento de la señal anódica de SeCyst (Figura 1b, apartado 8.2) en ausencia de un ion metálico se puede ajustar a una línea sigmoidea con una pendiente máxima de 63 mV y un punto de inflexión de 3.4. Los ajustes pueden estar afectados por el número de puntos en la región de pH más ácido, algo que resulta difícil de controlar, una vez que se trabaja en medio no amortiguado. En todo el conjunto de datos, las pendientes del componente SeCyst (obtenido a partir de los algoritmos quimiométricos) son consistentes, aunque en algunos casos la hidrólisis del ion metálico afecta estos valores (por ejemplo, sistema equimolar SeCyst:Pb, Tabla 1 en el apartado 8.2). La aplicación de GPA permite un ajuste satisfactorio de la señal del movimiento de la SeCyst (componente 2, Figura 3b, apartado 8.2) y el complejo Zn-SeCyst (componente 5, Figura 3b, apartado 8.2) a una línea recta con pendientes de 67 mV y 14 mV, respectivamente (Tabla 1, apartado 8.2), con un *lof* de 11.7%. Para el sistema de Cd/SeCyst, GPA permite un ajuste satisfactorio de la señal de movimiento del complejo Cd-SeCyst (componente 4, Figura 3d, apartado 10.2) con un punto de inflexión de 5.9 y una pendiente de 21 mV (Tabla 1, apartado 10.2), con un *lof* de 8.5%.

Como se discutió previamente, la pendiente E_p *vs* pH permite obtener la relación H^+/e^- en la reducción electroquímica del complejo, información útil para la formulación de los modelos de complejación. Considerando la señal anódica de la SeCyst sola (ausencia de iones metálicos), se obtuvo una relación de H^+/e^- con valores próximos a la unidad, lo que sugiere que en la reducción de Hg_n^{2+} (n =1 o 2) dos protones son conducidos a lo largo del proceso de desorción de la SeCyst. Los resultados obtenidos para el ligando muestran una buena concordancia con el conjunto de datos para Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} y Pb^{2+}. De ello se deduce que no se formaron complejos metálicos, como demuestra el hecho que la SeCyst mantiene la relación H^+/e^- (ver la Tabla 1 del apartado 8.2, para las valoraciones de pH en presencia de Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} y Pb^{2+}). Además, en estas matrices, el movimiento lateral de la señal anódica de la SeCyst ocurre en el mismo intervalo de potenciales mostrado en la Figura 1 (apartado 8.2) y su perfil de concentración varia solamente debido a la desprotonación de los grupos que interfieren en la adsorción del ligando en el material del electrodo [18].

Para los casos de Co^{2+} y Ni^{2+} las señales del complejo metálico no se pueden seguir debido a la formación de complejos electroinactivos. Así, para la mezcla equimolar Ni^{2+}:SeCyst al pH ácido inicial (Figura 2c, apartado 8.2), se pueden observar las señales de SeCyst (componente 1, -0.65 V) y Ni^{2+} (componente 3, -1.2 V). Cuando se aumenta el pH aparece un nuevo pico a -0,85 V. En las correspondientes matrices de datos, donde se supone que ocurre la complejación, solo se puede seguir la señal anódica de la SeCyst, y su relación H^+/e^- es similar a la SeCyst sola (Fig. 1).

El algoritmo GPA nos permite obtener los perfiles de concentración de los tres componentes, con una *lof* de 10.3% (Figura 2d, apartado 8.2). Los resultados muestran que, a pH ácidos, no hay

ninguna interacción Ni-SeCyst (o si la hay es muy débil). Con el aumento de pH el perfil de concentración de los dos componentes disminuye en la misma proporción, lo que sugiere la formación de un complejo de estequiometría 1:1, y que la nueva señal que aparece a partir de pH 6, a potenciales intermedios (componente 2, $E_{pH\ final}$ = -0.99 V), se puede asignar a la reacción anódica del electrodo de Hg en presencia del complejo Ni(SeCyst).

En cuanto a los complejos metálicos electroactivos (formados con Cd^{2+} y Zn^{2+}), las relaciones H^+/e^- próximas a cero parecen indicar que los H^+ no están involucrados en la reducción electroquímica de M^{2+} enlazado a la SeCyst. Por lo tanto los M^{2+} enlazados no están rompiendo el puente Se-Se. Según el perfil de concentraciones de la Figura 3.b, se forma el complejo Zn-SeCyst a partir de pH 5, que es justo cuando el componente 5, que corresponde a la reducción del Zn^{2+}, disminuye y el componente 2, que es la señal anódica de la SeCyst, casi llega a su valor mínimo. Solo el Cd^{2+} es capaz de enlazar SeCyst desde los valores de pH más bajos, como se puede observar en el componente 4 de la Figura 3d (apartado 8.2).

Los resultados de las valoraciones de pH son coherentes con los datos obtenidos por valoraciones calorimétricas (ITC) de SeCyst con Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, y Zn^{2+} a pH 7.4 (Tabla 1, apartado 8.3). En general las curvas se ajustan razonablemente al modelo "*one set of sites"* con un perfil exotérmico (Figura 1a) que indica la formación de complejos estables 1:1 M(SeCyst). El orden de la constante de formación de los complejos de SeCyst con los iones metálicos estudiados es Hg^{2+}>Cd^{2+}~Zn^{2+}>Ni^{2+}>Co^{2+}. Al inicio de la valoración las moléculas de SeCyst no tienen ninguna conformación concreta. Durante la valoración, la conformación de la SeCyst va cambiando debido a la formación del complejo, lo cual afecta la entropía del sistema. Además, los metales y la SeCyst están solvatados e interaccionan con los componentes de la disolución amortiguadora. Al formarse el complejo, las moléculas de agua y de los componentes de la disolución amortiguadora, que estaban coordinadas a los iones metálicos y la SeCyst, se liberan. En este punto se pueden relacionar los parámetros obtenidos en el ajuste de los datos experimentales con el fenómeno de la compensación entálpica-entrópica.

El análisis del sistema Hg/SeCyst ha sido más complicado, debido al patrón termodinámico diferente que mostraban las interacciones, con lo cual los parámetros ajustados son meramente tentativos. En los ajustes de las valoraciones con Hg^{2+} el valor de 'n' (*binding sites*) obtenido fue de 1.5. La aplicación de diferentes modelos de complejación con un valor de n = 1 no dio resultados satisfactorios. Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de datos voltamperométricos, con un electrodo de disco rotatorio de Au para Hg^{2+} a bajas concentraciones [25], han mostrado que la especie predominante es el complejo 1:1 Hg(SeCyst), y que también se forma el complejo Hg_2(SeCyst).

En la Tabla 1 (apartado 8.3) se observa que, cuando los enlaces son más estables (K_{ITC} más elevado), la entalpía (ΔH) tiene un valor negativo elevado, que está compensado por la pérdida de entropía. Esto indica el reforzamiento de los enlaces, que se opone a la movilidad del complejo y de sus constituyentes, conjuntamente con la formación de fuertes interacciones polares junto con la liberación de moléculas de disolvente, como resultado de la deshidratación anteriormente mencionado (de pares de intercambio iónico). En las valoraciones de Ni^{2+} el valor de ΔS fue desfavorable.

En conjunto, los valores más compensados se observaron en los procesos de complejación con los iones metálicos de radios iónicos más pequeños (Figura 1, apartado 8.3). El aumento de entropía asociado podría deberse a la mayor perturbación de la esfera de solvatación de los iones metálicos más pequeños (mayor densidad de carga en comparación con los iones metálicos más grandes) y

a los cambios conformacionales de la SeCyst. Sin embargo, como el conocimiento detallado del origen de los componentes de la entropía y la entalpía de la interacción entre SeCyst y estos iones metálicos es aún incompleto, nuestra propuesta está basada en la analogía con el comportamiento documentado de la complejación de iones metálicos con ligandos que contienen el grupo Cys [26].

Para los iones metálicos del primer periodo de transición estudiados (Cr, Co, Ni, Cu y Zn) se observaron diferentes tipos de interacciones. Con respecto al Cu, la mayoría de las publicaciones abordan la complejación del ion Cu^{+}, que suele ser más reactivo que Cu^{2+} y que, junto con Fe^{2+}, se considera esencial en la actividad antioxidante de muchos compuestos del selenio [27]. Resultados experimentales obtenidos con RMN indican que el Cu^{+} es capaz de enlazar el átomo de Se no terminal de la SeMet [28], pero en el caso de la SeCyst el enlace Se-Se suele ser demasiado estable para ser roto. En contraste con la coordinación del Cu^{2+}, debido a que el Cu^{+} típicamente adopta una geometría de coordinación tetraédrica, es probable que muchos de los compuestos de selenio se unan a Cu^{+} a través del átomo de selenio, así como a través del nitrógeno de la amina y/o un átomo de oxígeno del carboxilato. Por una parte la SeCyst interactúa fuertemente con Ag^{+}, que tiene una configuración electrónica similar al ion Cu^{+} [18]. Por otro lado, la fuerte interacción entre los iones Cu^{2+} y los tioles está relacionada con la oxidación de grupos tioles a puentes disulfuro y la reducción de Cu^{2+} a Cu^{+}, que en el caso de SeCyst (ya oxidado) no es posible [29].

En cuanto a la baja afinidad de Pb^{2+} para con SeCyst, este hecho no es extraño si tenemos en cuenta su interacción menor con los grupos amino del péptido, en comparación con otros metales de transición como Cd^{2+}, Co^{2+} o Zn^{2+}. Una explicación similar fue dada para explicar la complejación relativamente débil de Pb^{2+} con glutatión [27].

En el trabajo 8.2, la baja intensidad de la señal corresponde a la reducción directa del complejo ZnSeCyst (componente 5). Esto, además de la anchura de pico, indica que el proceso de reducción electroquímica es irreversible. En este caso parece razonable asumir que los iones Zn^{2+} están enlazados a la SeCyst a través de los grupos carboxilato, que están desprotonados y, tal vez, y con una contribución menor, a los grupos amino. La rotura del puente Se-Se parece altamente improbable.

El comportamiento de los sistemas de complejación competitiva de la SeCyst se estudió siguiendo los dos modelos anteriormente expuestos en la Tesis: (1) estudio de la complejación competitiva de una mezcla de iones metálicos (Zn^{2+} y Cd^{2+}) en presencia del ligando y (2) estudio de la complejación competitiva de ligandos (SeCyst y GSH) en presencia del ion Cd^{2+}.

En el apartado 8.3 se ha llevado a cabo, mediante combinaciones de técnicas y métodos utilizadas previamente en esta tesis (DPP/GPA y CD/MCR-ALS), el estudio de la competición entre Cd^{2+} y Zn^{2+} para la complejación de SeCyst. El estudio se ha llevado a cabo mediante la valoración de una solución equimolar de Cd^{2+}:SeCyst, a pH 7.4, con Zn^{2+} (Figura 2). En el trabajo anterior, y en la primera parte del apartado 8.3, se habían investigado las características de las interacciones individuales, mediante DPP y ITC.

Como en los capítulos anteriores, se puede hacer una estimación de las constantes de formación de los complejos metálicos a partir de los datos electroquímicos, a través de la ecuación de Nernst. Hay que remarcar que los valores obtenidos por ITC son más exactos, y no son solo estimaciones como en el caso de los obtenidos a partir de los datos de DPP.

Si comparamos K_{ITC} y K_{DPP} (valores estimados) en las mismas condiciones de pH y solución amortiguadora, para la complejación de SeCyst con Cd^{2+} y Zn^{2+}, los valores de DPP son más elevados que los obtenidos por ITC. En solución de TRIS, los valores de K_{DPP} son: $K_{DPP}= 3.77x10^{5}$

(Cd-SeCyst) y K_{DPP}= 4.18x10^4 (Zn-SeCyst). Por tanto, no son de esperar desplazamientos significativos del Cd^{2+} enlazado con la SeCyst por parte del Zn^{2+} y viceversa. Hay que tener en cuenta, una vez más, que los valores de la estimación de la K_{DPP} son sobrestimaciones, ya que el parámetro utilizado ($\Delta E_{|M/ML|}$) no sólo tiene un componente termodinámico sino también una contribución cinética de la reducción de los metales. Además, la contribución cinética de los complejos de Cd^{2+} es posiblemente mucho mayor que la de los complejos de Zn^{2+}, sobrestimando los valores de K_{DPP} de los complejos de Cd^{2+}.

En la valoración de competición (apartado 8.3, Figura 2) el Zn^{2+} no es capaz de desplazar el Cd^{2+} de sus complejos con la SeCyst, sino que se introduce parcialmente en el complejo Cd-SeCyst, dando lugar al complejo mixto. Los datos por CD indican que cuando el Zn^{2+} se añade a la disolución que ya contiene Cd^{2+} y SeCyst, al igual que en DPP, se observa que el Zn^{2+} se introduce parcialmente en el complejo Cd-SeCyst. La presencia de dos componentes activos en CD, junto con los resultados de DPP, nos permite proponer la formación del complejo mixto ZnCd(SeCyst).

Respecto a la competición entre ligandos, al igual que en otros sistemas con metal y péptidos que contienen el grupo tiol (Capítulo 8), los resultados evidenciaron que el péptido de cadena más larga desplaza al ligando más corto de sus complejos metálicos. Además, el desplazamiento es muy rápido, ya que se alcanza el equilibrio dentro de los pocos minutos entre cada adición, seguida de agitación de la solución, y el posterior barrido de potencial.

El análisis por GPA de la matriz de datos proporciona los perfiles de concentración (apartado 8.3, Figura 6b; 6.29% lof) que muestran que el componente 3 (complejo Cd-GSH, E=-0.65 V) sufre una disminución drástica desde la primera adición de SeCyst, y alcanza un valor mínimo para la proporción 1:1 SeCyst:Cd^{2+}. Este resultado indica la sustitución completa de GSH por SeCyst en el complejo. Paralelamente, el componente 5 (complejo CdSeCyst, E=-0.79 V) aumenta continuamente, como también aumenta el componente 2 (que se debe a una señal anódica del GSH desplazado del complejo a -0,51 V) a un valor de la relación SeCyst:Cd^{2+} de 0.5, y el componente 4 (señal anódica de SeCyst en exceso a -0.68 V) a una relación de 1.5.

8.5 Referencias

1. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2008,** *42* (8), 2860-2866.
2. Chekmeneva, E.; Prohens, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analytical Biochemistry* **2008,** *375* (1), 82-89.
3. Chekmeneva, E.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Environmental Science and Technology* **2009,** *43* (18), 7010-7015.
4. Chekmeneva, E.; Gusmão, R.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Metallomics* **2011,** *3* (8), 838-846.
5. Díaz Cruz, J. M.; Sanchís, J.; Chekmeneva, E.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analyst* **2010,** *135* (7), 1653-1662.
6. Cavanillas, S.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Analytica Chimica Acta* **2011,** *689* (2), 198-205.
7. Papp, L. V.; Lu, J.; Holmgren, A.; Khanna, K. K., *Antioxidants and Redox Signaling* **2007,** *9* (7), 775-806.
8. Rayman, M. P., *The Lancet* **2000,** *356* (9225), 233-241.

9. Mostert, V., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **2000,** *376* (2), 433-438.
10. Loflin, J.; Lopez, N.; Whanger, P. D.; Kioussi, C., *Journal of Inorganic Biochemistry* **2006,** *100* (10), 1679-1684.
11. D. Thomson, C., *Analyst* **1998,** *123* (5), 827-831.
12. Huber, R. E.; Criddle, R. S., *Archives of Biochemistry and Biophysics* **1967,** *122* (1), 164-173.
13. Surai, P. F., *World's Poultry Science Journal* **2002,** *58* (3), 333-347.
14. Szpunar, J., *Analyst* **2000,** *125* (5), 963-988.
15. Cabañero, A. I.; Madrid, Y.; Cámara, C., *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **2005,** *53* (6), 2125-2132.
16. Cabañero, A. I.; Madrid, Y.; Cámara, C., *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **2005,** *381* (2), 373-379.
17. White, P. C.; Lawrence, N. S.; Davis, J.; Compton, R. G., *Electroanalysis* **2002,** *14* (2), 89-98.
18. Bai, Y.; Wang, Y. d.; Zheng, W. j.; Chen, Y. s., *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **2008,** *63* (1), 110-115.
19. Esteban, M.; Ariño, C.; Díaz-Cruz, J. M., *Critical Reviews in Analytical Chemistry* **2006,** *36* (3-4), 295-313.
20. Grossoehme, N.; Spuches, A.; Wilcox, D., *Journal of Biological Inorganic Chemistry* **2010,** *15* (8), 1183-1191.
21. Wilcox, D. E., *Inorganica Chimica Acta* **2008,** *361* (4), 857-867.
22. Plano, D.; Lizarraga, E.; Font, M.; Palop, J. A.; Sanmartín, C., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2009,** *98* (2), 559-566.
23. Plano, D.; Lizarraga, E.; Palop, J. A.; Sanmartín, C., *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **2011,** *105* (3), 1007-1013.
24. Broadley, M. R.; White, P. J.; Hammond, J. P.; Zelko, I.; Lux, A., *New Phytologist* **2007,** *173* (4), 677-702.
25. Gilsanz, C.; Gusmão, R.; Chekmeneva, E.; Serrano, N.; Díaz-Cruz, J. M.; Ariño, C.; Esteban, M., *Electrochimica Acta* **2011,** *56* (17), 5988-5992.
26. Wilcox, D. E., *Inorganica Chimica Acta* **2008,** *361* (4), 857-867.
27. Battin, E. E.; Zimmerman, M. T.; Ramoutar, R. R.; Quarles, C. E.; Brumaghim, J. L. *Metallomics* **2011**, *3*, 503−512.
28. Wang, H. C.; Riahi, M.; Pothen, J.; Bayse, C. A.; Riggs-Gelasco, P.; Brumaghim, J. L. *Inorganic Chemistry* **2011**, *50*, 10893−10900.
29. Leal, M. F. C.; van den Berg, C. M. G. *Aquatic Geochemistry* **1998**, *4*, 49−75.
30. Cruz, B. H.; Díaz-Cruz, J. M.; Díaz-Cruz, M. S. ri o, C. steban, M. Tauler, . *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2001**, *516*, 110−118.

Capítulo 9

Electron transfer to and from Ferrocene bound at a non-uniform electrode surface: theory and experiment

9.1 Introduction

Throughout this Thesis it has been shown that electrochemical detection of thiol species provides a significant analytical challenge as evidenced by the multitude of approaches. The need to address problems of poor sensitivity and selectivity has been recognized and many attempts have been made to tackle these two important issues. Direct amperometric measurement of the thiol in untreated samples is undoubtedly the most attractive path [1,2]; however, in practice there tend to be many obstacles for this method to be viable; in particular the complex composition of the majority of physiological fluids presents significant problems in terms of electrode fouling. More importantly, the presence and un-wielding voltammetric behavior of other electroactive species such as ascorbate and urate can severely compromise the accuracy of the thiol signal.

The use of solid electrodes in which Hg is excluded from the protocol often means that oxidation of the thiol will be the principal detection methodology. This is usually achieved through electrocatalytic conversion in which an electron transfer mediator is employed. Metal complexes are the most common type of mediators and have included metallophthalocyanines [3]), mixed valence hexacyanometallates (Ru/In/Fe [4]), mixed valence ruthenium oxide - cyanide ruthenium(III) diphenylthiocarbamate [5].The majority tend to work on the principle exemplified in Figure 9.1.

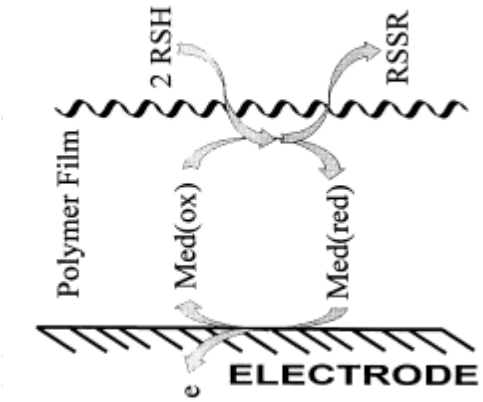


Figure 9.1 – Schematic representations detailing the electrocatalytic thiol oxidation.

The thiol is chemically oxidized by the metal complex, which is subsequently regenerated at the electrode with the concentration of the thiol correlated to the increased oxidation current. Retention of the mediating species is often the main problem, particularly for those systems employing flow delivery. Physisorption is the most simple immobilization approach and has been employed for large macrocycles such as cobalt phthalocyanine and aquocobalamin. The hexacyanoferrate systems possess an advantage over the macrocycles in that they can be electrodeposited onto the electrode surface to form an insoluble film through repetitive redox cycling. Getting stable, robust films, however, often lies with the expertise of the investigator and in many cases deterioration in the response through loss of the film

constituents is inevitable. The most common recourse, however, has been the addition of polymeric coatings (typically Nafion). In addition to stemming the decrease in electrode response, they can often provide a degree of protection against fouling from matrix constituents and can aid selectivity through the electrostatic repulsion of anionic interferences [6].

For both RSH and RSSR the direct oxidation requires high overpotentials,for example the anodic reaction of GSSG at Au or Pt electrodes is mediated by surface oxides whose potential lies in the region of the GSSG response, therefore complicating the analytical applications. Poor voltammetry is observed directly at the electrode surface, especially metals, when surface passivation occurs. As a result of the passivation and need for high overpotentials in order to improve the observed signals by modifying the electrode surface, as a result there are now an array of electrode modifications. A variety of electrodes have been studied for the electroanalytical chemistry of thiols with carbon proving the most popular electrode material. The aim of a mediator or modification is to either increase the amplitude of the voltammetric signal for thiol or enhance the selectivity for thiol oxidation.

9.1.1 Carbon Based Electrodes

The most popular carbon based electrode still is the glassy carbon (GCE), used in various papers such as using mediators [7], but there are various surface modifications such as; metals in polymers, electrodeposited metals, nanoscale carbon depositions, and enzymes immobilised on the electrode surface. Glassy carbon is comprised of a structure of interwoven ribbons of the graphite structure (Figure 9.2). This structure means glassy carbon is a much harder form of graphite, and it is impermeable to liquids or gases.

The other carbon based electrodes used include basal plane pyrolytic graphite (BPPD), edge plane pyrolytic graphite (EPPG), screen printed electrodes (SPE), [7]. The most recent is Graphene, a two-dimensional sheet of sp^2 bonded carbon atoms, which can be viewed as an extra-large polycyclic aromatic molecule[8]. In this section of the Thesis EPPG was used in most of the electrochemical studies. Each type of carbon electrode has different ratios of defect sites (edges and steps) which will affect the electrode reactivity. Carbon electrodes are thought to give a response by direct and mediated means reflecting the array of functionalities present on the surface. Carbon nano-tubes (CNTs)[9] have some use although they are more expensive than other sources of carbon for electrode modification such as graphite powder.

EPPG and BPPG are fabricated from highly ordered pyrolytic graphite (HOPG). The basal plane surface of an HOPG electrode consists of layers of graphite which lie parallel to the surface and with an interlayer spacing of 3.35 A°. Surface defects occur in the form of steps exposing the edges of the graphite layers. Due to the nature of the chemical bonding in graphite, the two planes, edge and basal, exhibit completely different electrochemical properties. For electrochemistry the edge plane exhibits considerably faster electrode kinetics in comparison with the basal plane. This means that in many instances an electrode consisting entirely of edge plane *viz.* an edge plane pyrolytic graphite electrode will show a nearly reversible voltammogram while an electrode consisting mainly of basal plane will show irreversible behavior depending highly on the amount of edge present.

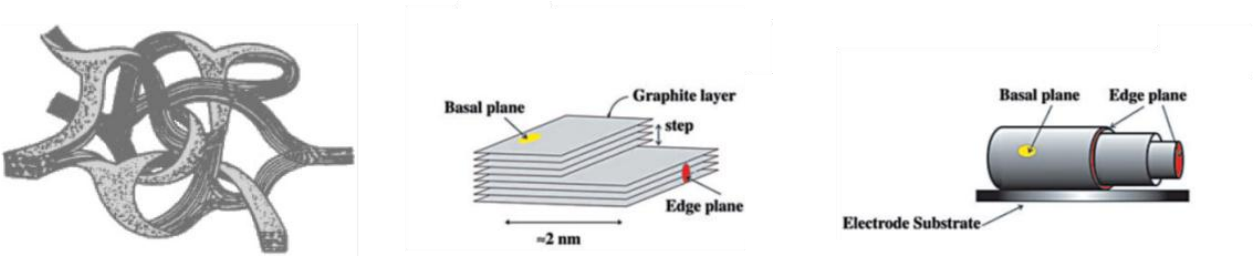


Figure 9.2 – Schematic representation of graphite structure in GCE (left), representation of a crystal of highly ordered pyrolytic graphite where the layers of graphite have an interlayer spacing of 3.35 A. This corresponds to a single MWCNT in which edge-plane-like sites are shown at the end of the tube and along the tube axis (center). These similarities result in identical electrochemical responses for CNT-modified electrodes when compared with the edge-plane pyrolytic graphite electrode (right) [10].

At the entrance of the century, there were many claims of exceptional and outstanding electrochemical properties of CNTs although nobody understood exactly why enhancements of the currents or lowering of the redox potentials occurred. It was the golden age for discovering to what compounds CNTs exhibited more sensitive response at lower potentials. The main problem with the results of the electrochemistry of CNTs was that the redox potentials of a single compound differed significantly among different research groups and also among different CNT samples. Nothing matched with anything else. In some cases, amperometric currents of CNTs were similar to graphite [11]; in other cases, they differed significantly [11]. In some cases, the oxidation potentials of solutes on CNTs were lower than on graphite; in other cases, the differences were small. The main problems identified were:

- Metallic impurities within CNTs strongly influence redox properties of solutes and are responsible for a large portion of the observed “electrocatalytic” behavior of CNTs;
- Nanographite impurities within CNT samples have a strong influence on the electrochemistry of many solutes;
- Oxygen-containing groups on CNTs and the structures of CNTs have profound effects on their electrochemical properties.

CNTs are formed in two principal types: single walled carbon nanotubes (SWCNTs) which consist of a single tube of graphite, and multi walled carbon nanotubes (MWCNTs) which consist of several concentric tubes of graphite fitted one inside the other. The diameters of CNTs can range from just a few nanometres in the case of SWCNTs to several tens of nanometres for MWCNTs. The lengths of the tubes are usually in the micrometer range. It is the small size of CNTs which often accounts for their unique properties and imparts important advantageous properties for electroanalysis such as their large surface area (typically 200–300m^2 g^{-1}).

9.1.2 Electrode Surface Modification

Functionalization of graphitic surfaces is of fundamental and technological importance because carbon-based materials are used in the fields of energy conversion, molecular electronics, and sensors. The most common forms of electrode modifications present in the literature are; the use of quinone or catechol like moieties as reaction partners, the use of enzymes and the use of film electrodes which can incorporate both of the aforementioned methodologies as co-factor in the film. The aims of all the modifications are to enhance the voltammetric signal for GSH oxidation at the electrode.

In film covered electrodes, the polymer film works by altering the electrode surface; increasing the surface area, acting as a mediator, providing a fixation site for co-factors and minimising electrode fouling. Increasing the surface area leads to the number of reactive sites also increasing, in turn giving an amplified voltammetric response, which may lead to an increased signal to noise ratio [12] however the baseline capacitance is also inherently increased so this is not always the case. The use of films allows for repeatable voltammetry as the impregnation of the co-factors in the film allows their secure affixation to the surface giving greatly reduced leaching [13] and excellent long term stability[14] versus casting onto the electrode surface. Films may also decrease surface passivation [13] by restricting access to or blocking the bare metal surface so the thiol cannot adsorb to it.

The film is often created via electropolymerisation [15]. The downsides to film coatings including those impregnated with cofactors are cost, and modification time. Overall though the customizable nature of film covered electrodes provides great scope for tailoring the film's properties and optimizing analytical results while reducing their downsides.

In the case of an electroactive species uniformly attached onto an electrode surface by either physical adsorption or chemical bonding, mass transport effects can be neglected. The observed voltammetry becomes controlled only by the electrode kinetics. As a result, totally symmetric forward and backward peaks will be observed in the "reversible" (fast electrode kinetics) case. The current will drop back to zero at the point when the electroactive species is totally depleted on the electrode surface rather than a diffusion limited value. (Figure 9.3)[16].

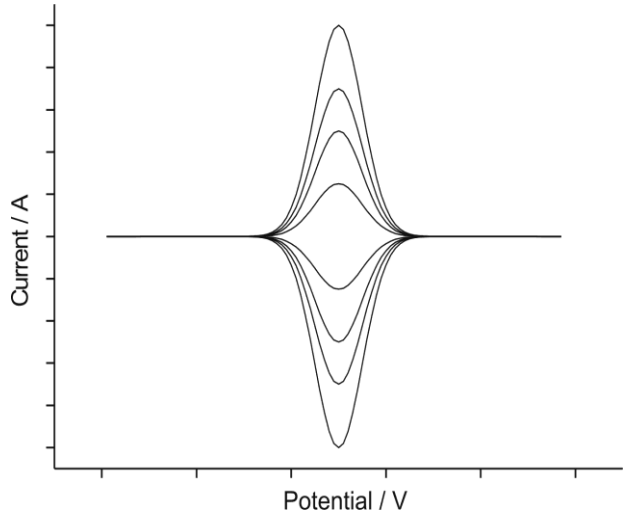


Figure 9.3 – Typical CV for a surface bound specie.

9.2 Results and Discussion

9.2.1 Presentation of the work and objectives

9.2.1.1 Application of the Marcus-Hush-Chidsey model to surface-bound redox couples

Together with the Butler–Volmer (BV) formalism [17,18], the Marcus–Hush approach (MH) [19] is commonly employed for modelling the kinetics of charge transfer interfacial processes (electrode reactions, transfer at liquid–liquid interfaces). Yet, for its development the symmetric form of Marcus theory has been considered; parabolae of equal curvature describe the Gibbs energy curves of reactants and products. Additionally, the density of metallic states and the extent of electronic coupling between metallic states and electroactive species are presumed to be independent of the applied potential. In the case of surface-bound redox couples, these assumptions have been supported by successful description of many systems over years [20, 21, 22]. In the Appendix A1 it can be found a short introduction for both the BV formalism and Marcus electron transfer theory. For a potential step applied to a surface bound redox couple the current, i (A), is given by:

$$i = F\Gamma k_{app}\exp(-k_{app}t) \qquad (9.1)$$

where F is the Faraday constant, Γ is the electrode coverage (mol cm^{-2}), t is time (s) and k_{app} is the apparent rate constant (s^{-1}) which is equal to the sum of the oxidative and reductive rate constants ($k_{ox} + k_{red}$). Thus a plot of ln|i| *vs* t will be linear with a slope of $-k_{app}$, making potential step chronoamperometry an ideal method for the interrogation of electron transfer kinetics, specifically for investigating how k_{app} varies with the applied potential. Figure 9.4 shows an illustrative plot of k_{app} against the applied overpotential for both BV and MHC formalisms. As can be seen in Figure 9.4 the greatest difference between the two kinetic models occurs for small values of reorganisation energy which, according to Marcus theory, yield fast rate constants. In some cases it may therefore be necessary to employ a technique such as ultrafast voltammetry [23] in order to probe the electrode kinetics.

In his seminal work, Chidsey [24] used potential step chronoamperometry to study the oxidation of Fc groups bound to a gold electrode via a long alkylthiol chain. The experimental dependence of the rate constant showed marked deviation from the BV theory, reaching a plateau rather than continuing to increase exponentially (exemplified in Fig. 9.4). The Marcus–Hush–Chidsey (MHC) model, which had been developed earlier in the same work, however, was able to reproduce this levelling off of the apparent rate constant with striking accuracy. Accurate fitting of the experimental data was possible across a wide range of temperatures taking the reorganisation energy to be 0.85 eV (close to the theoretically estimated solvent reorganisation of 0.94 eV).

The excellent agreement between theory and experiment for this system gives justification for the approximations used in the derivation of the MHC theory: the symmetry of the data indicated that the forward and back reactions had equal (or at least very similar) reorganisation energies and the density of states in the electrode is approximately

independent of potential or the limiting rate constants at high positive and negative overpotentials would differ.

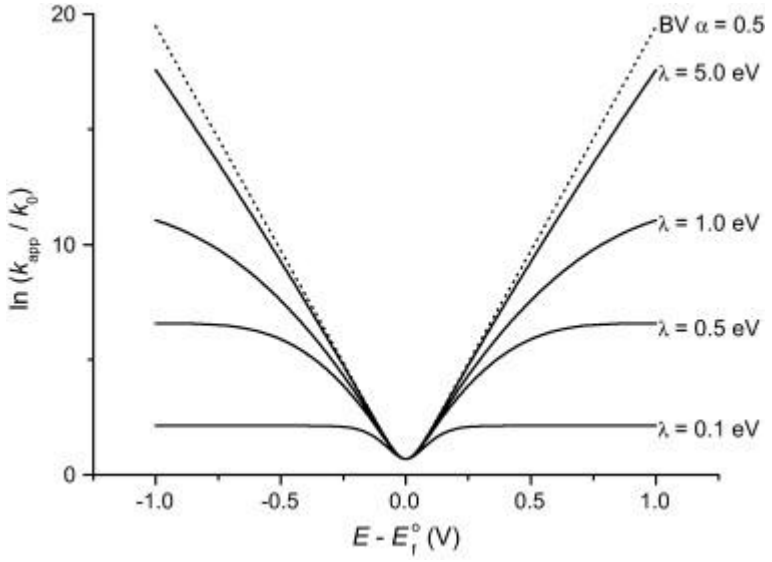


Figure 9.4 – Plot showing the variation of the apparent rate constant (as in Eq. (9.1)) with overpotential for both Butler-Volmer (dashed line) and Marcus-Hush-Chidsey (solid lines) models.

9.2.1.2 "Clicking" functionality onto electrode surfaces

A method to graft aryl molecules onto graphitic surfaces by electrochemical reduction of the corresponding aryl diazonium ions is used for electrode surface modification.[25] Aryl radicals formed react with the graphene sheets to form direct C-C bonds [26]. However, the radical intermediate leads to formation of multilayer structures of aryl molecules ranging from 0.7 to 15 nm in height on the surface. Such multilayers are not ideal for coupling redox molecules to the electrode because of the ill-defined electron-transfer path. Methods recently developed to couple alkynes require high-temperature treatment of up to 400 °C, and alkenes require photochemical treatment, limiting these methods to molecules stable to high temperature and radiation, respectively. Other general methods of coupling molecules to graphitic surfaces are oxidative in nature. Oxidative methods form various oxygenated functional groups on graphite,[26] making it difficult to understand the exact nature of the linker between the surface and the molecule.

The copper-catalyzed azide–alkyne 1,3-cycloaddition reaction (CuAAC, see Figure 9.6) is among the recently discovered transformations that have rapidly crossed traditional disciplinary boundaries. The process has emerged as the premier example of "click chemistry", a term coined in 2001 by Sharpless to describe a set of 'near-perfect' bond-forming reactions useful for rapid assembly of molecules with desired function [27]. Click transformations are easy to perform, give rise to their intended products in very high yields with little or no byproducts, work well under many conditions, and are unaffected by the nature of the groups being connected to each other. Azides and unactivated alkynes are almost entirely unreactive towards the functional groups normally encountered in nature; they react only with each other.

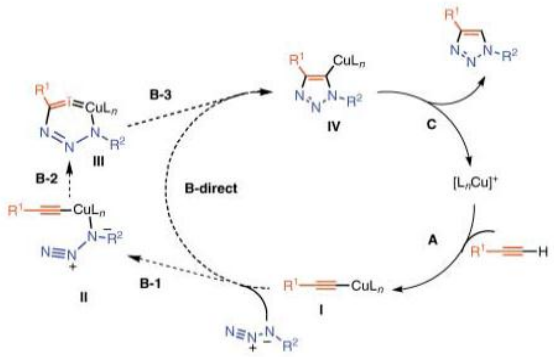


Figure 9.5 – Proposed catalytic cycle for the Cu(I)-catalyzed ligation.

While a number of Cu(I) sources can be used directly, the catalyst is better prepared in situ by reduction of Cu(II) salts, which are less costly and often purer than Cu(I) salts [28]. As the reductant, ascorbic acid and/or sodium ascorbate proved to be excellent [29] for they allow preparation of a broad spectrum of 1,4-triazole products in high yields and purity. The reaction appears to be very forgiving and does not require any special precautions. It proceeds to completion in 6 to 36 hours at ambient temperature in a variety of solvents, including aqueous tert-butyl alcohol or ethanol and, very importantly, water with no organic co-solvent [27]. Although most experiments may be performed at near neutral pH values, the catalysis seems to proceed well at pH values ranging from approximately 4 to 12. In other words, this should be very robust catalytic process, which is so insensitive to the usual reaction parameters as to strain credulity [27].

In the present work, we explored the possibility of grafting phenylacetylene layer on graphite electrodes by means of electrochemical reduction of their corresponding phenylazide and phenylacetylene diazonium salts, and then coupling chemoselectively acetylene- or azide-bearing molecules by click chemistry, as depicted in Figure 9.6 .The surface coverage of reactive azide or ethynyl groups has been quantified electrochemically through the complementary coupling of simple redox-active probes, that is, ethynylferrocene (Fc-C≡CH) [30].

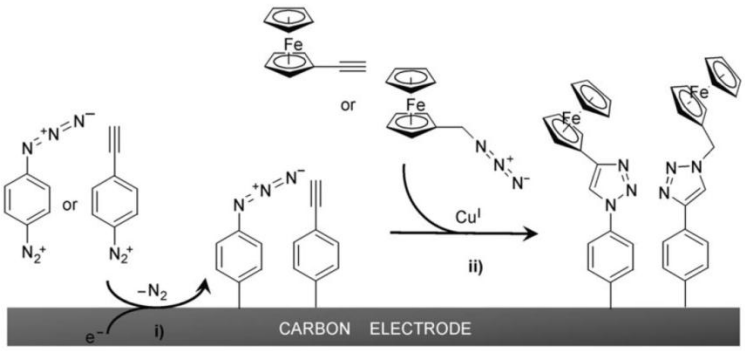
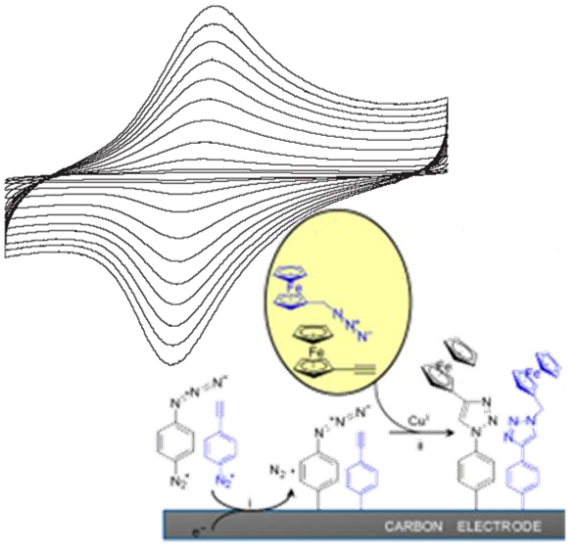


Figure 9.6 – Illustration of the multistep functionalization of carbon electrodes. Electroreduction of the diazonium salt for covalent immobilization of phenylazide or phenylacetylene molecules; ii) Cu^+-catalyzed 1,3-dipolar cycloaddition between the immobilized azide or alkyne functions and the soluble molecules (ferrocene derivative) bearing the corresponding ethynyl or azide group.

Marcus–Hush–Chidsey theory of electron transfer to and from species bound at a non-uniform electrode surface: Theory and experiment

Henstridge, M. C.; Batchelor-McAuley, C.; Gusmão, R.; Compton, R. G.,

Chemical Physics Letters, *517* (1–3), 108-112 (2011)



Chemical Physics Letters 517 (2011) 108–112

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Chemical Physics Letters

journal homepage: www.elsevier.com/locate/cplett

Marcus–Hush–Chidsey theory of electron transfer to and from species bound at a non-uniform electrode surface: Theory and experiment

Martin C. Henstridge [a], Christopher Batchelor-McAuley [a], Rui Gusmão [b], Richard G. Compton [a,*]

[a] Department of Chemistry, Physical & Theoretical Chemistry Laboratory, Oxford University, South Parks Road, Oxford OX1 3QZ, United Kingdom
[b] Department of Analytical Chemistry, University of Barcelona, Mart i Franqus, 1-11, E 08028 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 8 August 2011
In final form 12 October 2011
Available online 18 October 2011

ABSTRACT

Two simple models of electrode surface inhomogeneity based on Marcus–Hush theory are considered; a distribution in formal potentials and a distribution in electron tunnelling distances. Cyclic voltammetry simulated using these models is compared with that simulated using Marcus–Hush theory for a flat, uniform and homogeneous electrode surface, with the two models of surface inhomogeneity yielding broadened peaks with decreased peak-currents. An edge-plane pyrolytic graphite electrode is covalently modified with ferrocene via 'click' chemistry and the resulting voltammetry compared with each of the three previously considered models. The distribution of formal potentials is seen to fit the experimental data most closely.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Carbon based electrodes find regular use within electrochemical experiments, in part due to their relative ease of modification and low associated costs. Application of such electrode materials range from point-of-use electroanalysis through to industrial scale synthesis [1]. Carbon is available in a variety of forms, of these graphite is of great significance not least for its use as an enzymic support [2] but also due to the fact that the electrochemical response of carbon nanotubes are often viewed as being analogous [3]. The graphitic surface is heterogeneous in nature exhibiting both edge and basal plane sites, where it is generally viewed that the rate of electron transfer is substantially less at the basal plane sites [4]. Consequently knowledge of how the surface structure influences the observed voltammetric response is imperative for the development of more sophisticated graphite based electrochemical systems.

Following the seminal work of Chidsey [5], Marcus–Hush theory has been widely applied in describing the redox activity of species adsorbed on an electrode surface [6–13]. While this theory has been very successful in modelling many systems, mainly on Au electrodes, it fails to adequately describe a number of systems which exhibit non-ideal broadening of voltammetric peaks [14–19], caused by a distribution of rates at which the adsorbate is oxidised or reduced. Through assessment of how the voltammetric response for the surface bound voltammetric wave deviates from 'ideality' we are able to gain greater insight into the interfacial chemistry occurring at the electrode/solution interface.

For redox species attached to graphite electrodes, kinetic inhomogeneity may be attributed to a number of causes; roughness of the electrode surface or disorder within the adsorbate monolayer could yield a distribution of distances over which electron tunnelling occurs; equally, covalent attachment of the adsorbed species at different crystal planes or to different functional groups on the electrode surface could alter the thermodynamic properties of the redox system and yield a distribution of formal potentials as studied by Albery et al. [20].

Rowe et al. [18] have studied these models of surface inhomogeneity within the context of potential step chronoamperometry and suggested that conventional analysis of such non-ideal systems could lead to erroneous determination of kinetic parameters. In the absence of a parameter controlling the extent of inhomogeneity the only variables able to affect the shape of the voltammetric wave are the rate constant and reorganisation energy. The broadened waves which are characteristic of inhomogeneous electrode surfaces are best approximated, in this situation, by a value of reorganisation energy which is smaller than the true value.

Honeychurch et al. have looked at other sources of voltammetric non-ideality for both reversible [21] and irreversible systems [22], including broadening caused by lateral interactions between adsorbate molecules as considered by Laviron [23]. However, in experimental work on a ferrocene-modified edge-plane pyrolytic graphite electrode we find that voltammetric broadening is unaffected by surface coverage and so varying adsorbate-adsorbate interactions cannot be the cause of any observed non-ideality. Smith and White have also considered the effects of monolayer thickness and dielectric on voltammetry [24].

* Corresponding author. Fax: +44 (0) 1865 275410.
E-mail address: richard.compton@chem.ox.ac.uk (R.G. Compton).

0009-2614/$ - see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.cplett.2011.10.023

Inhomogeneous, or rough, electrodes are ubiquitous in experimental electrochemistry and have been observed to show different behaviour to flat electrodes for diffusional systems. For example, rough electrodes have been shown to yield a 10-fold increase in the stripping peak intensity for some systems [25]. Rough electrodes have been modelled for diffusional systems by Menshykau et al. [26,27] using the diffusion domain approximation. Work by Kant and co-workers treated the rough electrode surface as fractal [28,29], however real electrodes are likely only approximately fractal. Another approach has been to use exact mathematical functions [30,31], however the solutions obtained using this method are only asymptotic and do not lend themselves to experimental applications. Gaussian distributions have been used to parameterise various other models of electrode inhomogeneity, notably by Albery [20] and Murray [18] for formal potentials and tunnelling distances, respectively, and it is these models which we shall consider in this work.

In this work we model the cyclic voltammetry of a surface-bound redox system using the 'classical' Marcus–Hush theory (as used by Chidsey) as well as considering two simple models for the kinetic inhomogeneity: a Gaussian distribution of formal potentials and a Gaussian distribution of electron tunnelling distances. These theoretical results are then used to consider experimental voltammetry for a ferrocene-modified edge-plane pyrolytic graphite (Fc-EPPG) electrode, whereby we are able to demonstrate that the source of non-ideality is likely related to the presence of a distribution of formal potentials arising from the differing environments present upon the electrode.

2. Theory

We consider the redox reaction $A + e \rightleftharpoons B$, in which A and B are both confined on the surface of an electrode. The current for this reaction is given by:

$$i = FA[-k_{red}\Gamma_A + k_{ox}\Gamma_B] \tag{1}$$

where F is the Faraday constant, A (cm^2) is the electrode area, Γ_x ($mol\ cm^{-2}$) is the surface coverage of species x and $k_{ox/red}$ (s^{-1}) are the rate constants for oxidation and reduction, respectively. Within the Marcus–Hush formalism for electron transfer at a metallic electrode [5,32,33] these rate constants are given by:

$$k_{red} = k_0 \exp\left[-\frac{\theta}{2}\right]\frac{I(\Lambda,\theta)}{I(\Lambda,0)} \tag{2}$$

$$k_{ox} = k_0 \exp\left[+\frac{\theta}{2}\right]\frac{I(\Lambda,\theta)}{I(\Lambda,0)} \tag{3}$$

where k_0 (s^{-1}) is the standard electrochemical rate constant (defined at the electrode surface), Λ and θ are dimensionless reorganization energy and dimensionless potential, respectively, defined thus:

$$\theta = \frac{F}{RT}(E - E_f^{\ominus})$$

$$\Lambda = \frac{F}{RT}\lambda$$

where E (V) is potential, $E_f^{\ominus}$ (V) is the formal potential, λ (eV) is reorganization energy, R is the gas constant and T (K) is the temperature. The integral

$$I(\Lambda,\theta) = \int_{-\infty}^{\infty} \frac{\exp\left[\frac{-(\epsilon-\theta)^2}{4\Lambda}\right]}{2\cosh\left[\frac{\epsilon}{2}\right]} d\epsilon \tag{4}$$

where ϵ is an integration variable, is evaluated numerically using the trapezium rule.

For a redox species confined at the electrode surface, k_0 given by [34,35]

$$k_0 = \frac{4\pi^2}{h}\rho\, H^2\, I(\Lambda,0)\ \exp(-\beta r_0) \tag{5}$$

where h is Planck's constant, ρ (eV^{-1}) is the density of states in the electrode, r_0 (Å) is the distance separating the redox centre from the electrode surface, H (eV) is the electronic coupling matrix at this distance and β ($Å^{-1}$) is the electronic coupling attenuation coefficient which takes a value of 1.59 $Å^{-1}$ in water[36].

The inhomogeneity of the electrode surface was modelled as a Gaussian distribution of parameter χ (either formal potential or tunnelling distance) with mean μ and standard deviation σ. A total of 300 cyclic voltammograms were simulated, spread evenly across the range $\chi = \mu \pm 3\sigma$. A weighted sum was then calculated to give the total current:

$$i_{total} = \frac{\sum_j Q_j\, i_j}{\sum_j Q_j} \tag{6}$$

with Q_j, the weighting of the jth simulation, being given by the Gaussian function:

$$Q_j = \exp\left[\frac{(\chi_j - \mu)^2}{2\sigma^2}\right] \tag{7}$$

and i_j is the current of the jth simulation, given by Eq. (1).

It should be noted that values of k_0 quoted in this work are defined at the electrode surface and are subject to Eq. (5), thus a value of $10^6\ s^{-1}$ at the electrode surface is equal to 0.113 s^{-1} at a distance of 10 Å from the electrode, assuming β takes the value 1.6 $Å^{-1}$.

For the simulations using homogeneous Marcus–Hush theory, in which no distribution of parameters was considered, σ was set equal to zero. In all cases Eq. (1) was solved numerically using the implicit finite difference method.

3. Theoretical results

Numerical simulations were performed using two models of inhomogeneity (Gaussian distributions of formal potentials and tunnelling distances) and the voltammetry compared with that simulated using Marcus–Hush theory for a uniform homogeneous electrode surface. Both models of inhomogeneity yield voltammetric waves which appear noticeably broader than those produced by Marcus–Hush theory for a homogeneous surface, with correspondingly decreased peak currents. The shape of the broadened

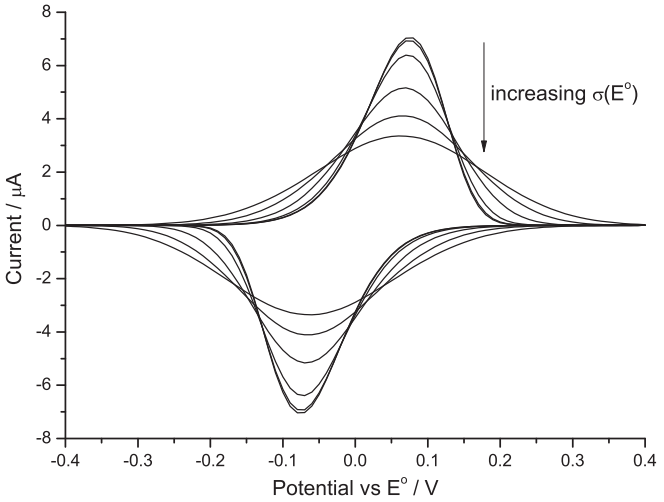


Figure 1. Typical voltammetry simulated using a Gaussian distribution of formal potentials, σ (mV) = 0, 10, 25, 50, 75, 100. Other parameters as in Table 1.

voltammetric wave, however, differs between the two models. Figure 1 shows a series of voltammograms simulated using a distribution of formal potentials with $\sigma(E^{\ominus})$ increasing from 0 mV (equivalent to the homogeneous model) to 100 mV (Tables 1 and 2). It can readily be seen that increasing the value of $\sigma(E^{\ominus})$ results in a broader voltammetric wave with a decreased peak current. The broadening can also be seen to occur symmetrically about the peak potential, consistent with the symmetrical nature of the Gaussian distribution of formal potentials, such that the peak potential remains the same for all values of $\sigma(E^{\ominus})$.

This is in contrast to voltammetry simulated using the distribution of tunnelling distances. Figure 2 shows simulations for a range of values of $\sigma(r_0)$ from 0 Å (equivalent to the homogeneous model) up to 3 Å (Tables 1 and 2). As with the distribution of formal potentials the peak current is seen to decrease with increasing $\sigma(r_0)$, however in this case the peak itself remains relatively sharp for all values of $\sigma(r_0)$. Due to the exponential dependence of rate constant on tunnelling distance (Eq. (5)), the distribution of k_0 values is weighted towards very slow kinetics. Thus increasing $\sigma(r_0)$ results an increasingly extended 'tail' at high overpotential, with appreciable Faradaic current continuing some tens or even hundreds of millivolts beyond the peak potential. A further consequence of this asymmetric distribution of rate constants is that the peak potential shifts to lower overpotential with increasing $\sigma(r_0)$, resulting in voltammetry which appears more reversible.

These qualitative differences in wave broadening resulting from the two different models can therefore be used as a diagnostic when deciding which model is most appropriate for simulating a particular experimental system.

Table 1
Parameters used to simulate the voltammetry in Figures 1 and 2. Scan rate 100 mV s^{-1}.

Parameter	No distribution	$E^{\ominus}$ distribution	r_0 distribution
$E^{\ominus}$/V	0	0	0
k_0/s^{-1}	4.4×10^6	4.4×10^6	4.4×10^6
λ/eV	1	1	1
r_0/Å	10	10	10
β/Å^{-1}	1.5	1.5	1.5
$\sigma(E^{\ominus})$/mV	–	50	–
$\sigma(r_0)$/Å	–	–	1

Table 2
Best-fit parameters for each model. Note that these values of k_0 are defined at the electrode surface and are subject to Eq. (5).

Parameter	No distribution	$E^{\ominus}$ distribution	r_0 distribution
$E^{\ominus}$/V	0.33	0.34	0.34
k_0/s^{-1}	5.3×10^6	7.1×10^6	4×10^6
λ/eV	10^{-4}	0.85	0.85
r_0/Å	10	10	10
β/Å^{-1}	1.6	1.6	1.6
$\sigma(E^{\ominus})$/mV	–	60	–
$\sigma(r_0)$/Å	–	–	3

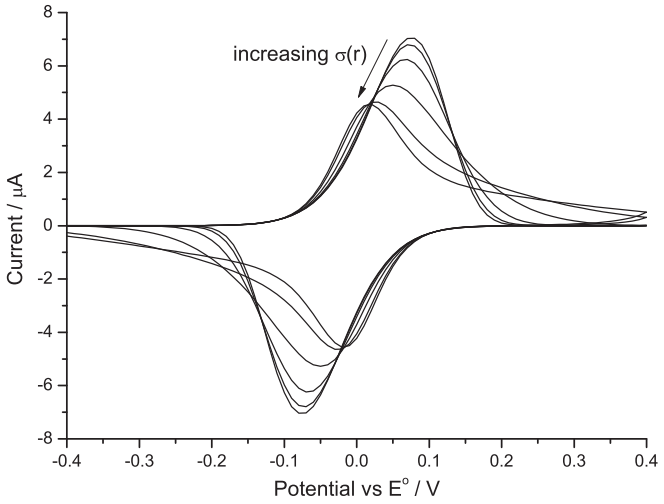


Figure 2. Typical voltammetry simulated using a Gaussian distribution of tunnelling distances, σ (Å) = 0, 0.25, 0.5, 1, 2, 3. Other parameters as in Table 1.

4. Experimental procedure

4.1. Reagents and equipment

All chemicals were purchased from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO) at the highest grade available and used directly without any further purification. All solutions were prepared with deionized water of resistivity not less than 18.2 MΩ cm^{-1} at 298 K (Millipore, Billerica, MA). All voltammetric measurements were recorded using a μAutolab type III computer controlled potentiostat (EcoChemie, Utrecht, Netherlands). A standard three electrode configuration was used throughout, consisting of an edge-plane pyrolytic graphite (EPPG, area 0.196 cm^2) working electrode, a platinum wire and a Ag/AgCl/Sat. KCl electrode acting as the counter and the reference electrodes, respectively. EPPG electrodes were polished successively by 1 and 0.3 μm alumina slurry on a cloth polishing pad and then washed in water under sonication.

4.2. Electrode modification

The synthesis of 4-azidobenzene diazonium tetrafluoroborate was carried out according to a literature procedure [37]. A cold solution of $NaNO_2$ (45 mg, 0.65 mmol) in Milli-Q water (0.25 ml) was added slowly to a cold solution (over an ice bath) of 4-azidoaniline hydrochloride (100 mg, 0.59 mmol) in 1 M HCl (1 ml). The mixture was left to react at 4 °C for 1 h, and then 0.6 ml of a saturated aqueous solution of $NaBF_4$ was added. The precipitated brown diazonium tetrafluoroborate was filtered and washed with cold ether, then dried in a desiccator and stored in the freezer.

Surface derivatisation of the EPPG electrode was carried out at 4 °C in a deaerated solution of 0.1 M HCl (10 ml) containing 1 mM of 4-azidobenzene diazonium tetrafluoroborate. The reductive electrodeposition of the aryl diazonium salt was achieved amperometrically by stepping the potential at a sufficiently cathodic value (working electrode potential was set for 1 min at −0.80 V). After functionalisation, the electrode was thoroughly rinsed with cold water.

The ferrocene probes were then coupled to the surface diazonium groups by copper (I)-catalyzed azide–alkyne cycloaddition according to a literature procedure [37]. Arylazide modified electrodes were immersed in a 5 ml Milli-Q water solution containing $CuSO_4$ (10 mM), L-ascorbic acid (10 mM), and ethynylferrocene (100 μM) over an ice bath. The click reaction was complete after 60 min. The Fc-EPPG electrode was then rinsed with cold Milli-Q water and ethanol to ensure removal of any physisorbed species.

4.3. Electrode characterisation

Cyclic voltammetry of the Fc-EPPG electrode was systematically recorded in 0.1 M KPF_6 at 20 °C over a wide range of scan rates (10–800 mV s^{-1}), as shown in Figure 3. A plot of peak current against scan rate was found to be linear (Figure 3 inlay), indicating that the

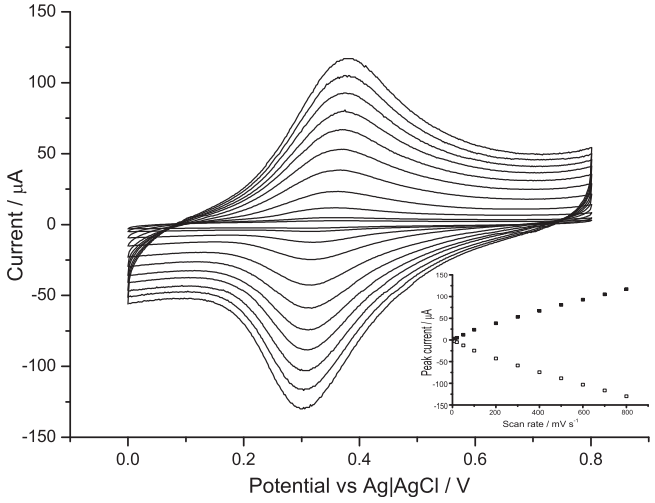


Figure 3. Experimental voltammetry of the ferrocene-modified electrode recorded over a range of scan rates, inlay plots the variation of the peak current against scan rate.

redox active species was, in fact, adsorbed on the electrode surface with the surface coverage calculated to be 1.0×10^{-9} mol cm^{-2}, equivalent to 16.6 Å^2 per molecule.

Due to the inherent roughness of the EPPG surface, the actual surface area of the electrode will be larger than the geometric surface area used to calculate surface coverage [38]. This value of surface coverage therefore corresponds to sub-monolayer coverage for a molecule the size of ferrocene.

With a high surface coverage the possibility of inter-adsorbate interaction needs to be considered. Laviron considered the voltammetry of adsorbed species within the framework of the Frumkin isotherm [23] and found that adsorbate-adsorbate interaction can cause changes in peak width. However, comparison of voltammetry recorded at this high coverage with voltammetry obtained using a lower coverage (6.0×10^{-10} mol cm^{-2}) shows that the full width half maximum (FWHM) is found to be almost the same for both coverages across the whole range of scan rates. Since an increase in surface coverage should lead to increased adsorbate-adsorbate interaction and therefore a change in FWHM, we shall assume that inter-adsorbate interactions are weak in this case and that experimental voltammetric broadening can likely be attributed to surface inhomogeneity alone.

4.4. Potential staircase effects

Cyclic voltammetry was performed using a potential staircase, while simulations were carried out assuming an analog potential ramp. The accuracy of this approximation was checked via comparison with a program simulating a series of potential steps, with each step being described by the analytical solution for a surface-bound chronoamperogram. The error was found to be less than 5% over the whole range of scan rates used.

5. Experimental results

The baseline-subtracted experimental voltammetry is observed to be highly broadened when compared with simulations of homogeneous Marcus–Hush theory (Figure 4 a), even when using an extremely small reorganisation energy of 10^{-4} eV as has been previously reported for an inhomogeneous electrode surface [14–19], with the simulated peak current being much too large. When compared with the simulations incorporating surface inhomogeneity, however, a much closer fit is achieved. The distribution of tunnelling distances achieves fairly good agreement with the experimental peak current and potential (Figure 4b), however the overall waveshape is qualitatively different; with the current initially rising too sharply, then decaying too slowly. In contrast the distribution of formal potentials has enabled excellent agreement between theory and experiment (Figure 4c), matching peak current, peak potential and achieving a very close fit for the overall shape of the voltammetric wave. The qualitative differences in fit between the two models strongly suggest that a distribution of formal potentials is the most likely contributing factor to the observed inhomogeneity in this system (Tables 1 and 2).

The Gaussian distribution of formal potentials also provides a better fit of peak potentials across the whole range of scan rates used. As can be seen in Figure 5, despite fitting very well at low scan rate, the distribution of tunnelling distances generally predicts a larger peak–peak separation than is observed experimentally, whereas the distribution of formal potentials fits fairly well across the whole range. Figure 5 demonstrates that even at low scan rates there is a non-zero peak separation. While this may be caused by the presence of non-uniform multilayers [24], hysteresis has also been explained in terms of a square scheme in which different paths for oxidation and reduction exist [39] as well as an 'N-shaped' free energy curve [40].

6. Discussion

While the use of Marcus–Hush–Chidsey theory assumes a perfectly metallic electrode [35] we tentatively assume that it might be applied to EPPG due to its high density of states [41–44]. H is assumed to be independent of potential and ρ is assumed to be constant. Thus k_0 is a function only of Λ and r_0 so is assumed to be constant for a given redox couple at a given distance from the electrode surface. While these assumptions make the application of Marcus theory to reactions at electrodes a more tractable problem, it should be noted that the model remains an approximation.

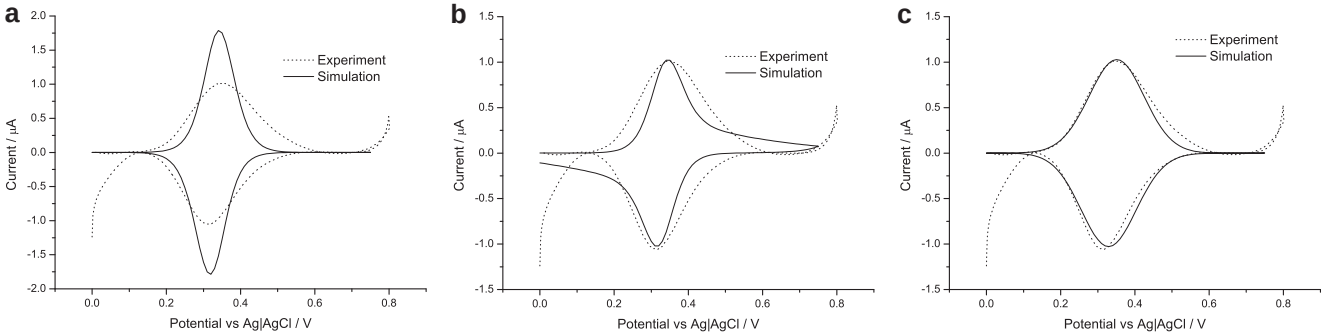


Figure 4. Comparison of baseline-subtracted experimental voltammetry (10 mV s^{-1}) with (a) homogeneous Marcus–Hush theory, (b) a simulated distribution of tunnelling distances and (c) a simulated distribution of formal potentials. Best-fit parameters are given in Table 2.

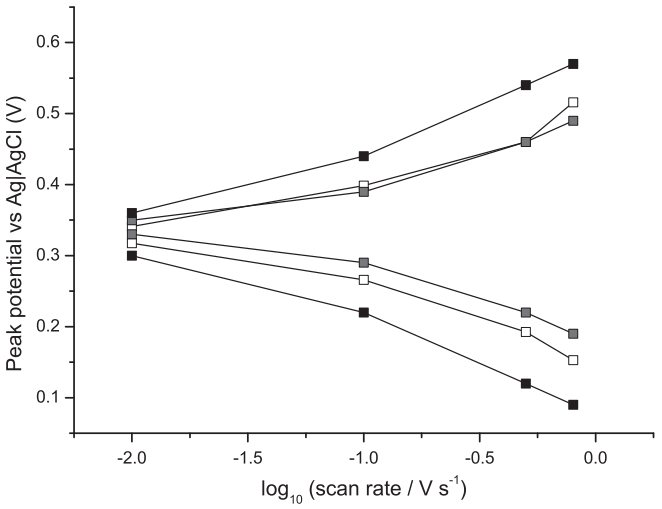


Figure 5. Plot of peak potential against log scan rate for both oxidative and reductive peaks. Experiment (white squares), distribution of formal potentials (grey squares), distribution of tunnelling distances (blank squares).

The value of λ used here in the simulations of both models of inhomogeneity is in excellent agreement with that reported by Chidsey for thiol-tethered ferrocene on a gold electrode [5], whereas the best fit achieved with the homogeneous model used a value which is several orders of magnitude smaller. This is in alignment with the conclusion of Rowe et al. that ignoring the effects of surface inhomogeneity leads to the extraction of erroneous values of kinetic parameters [18].

The successful fit of the voltammetric data via the use of the distribution of potentials, gives possible insight into the cause of the non-ideality. In light of the surface structure of the graphite material, it may be concluded that the varying solvation and local ionic atmosphere may be contributing to the observed variation in formal potentials. Further the bonding of the ferrocene group to different sites or crystal planes on the electrode surface may also lead to such thermodynamic shifts.

It should be noted, that despite the superior fit achieved by the inhomogeneous models, in order to achieve voltammetric broadening to such an extent it was necessary to use large values of σ. In particular for the distribution of formal potentials, the best fit was achieved using a value of $\sigma(E^{\ominus})$ equal to 60 mV, meaning that over the whole distribution $(\mu \pm 3\sigma)$ $\Delta G^{\ominus}$ would vary by 35 kJ mol^{-1}. However, the use of a Gaussian distribution to approximate surface inhomogeneity is only a rudimentary model. It is also possible that more than one parameter could show small variations simultaneously, rather than only one varying in isolation. It is possible that a more sophisticated model for surface inhomogeneity could yield similar voltammetric broadening with smaller variations in parameter values, but considering the simplicity of the model used the agreement with experiment is excellent.

7. Conclusion

Two different models for electrode surface inhomogeneity have been compared with both Marcus–Hush theory for a homogeneous surface and with experimental results. The voltammetric broadening reported in the literature is reproduced by both a Gaussian distribution of formal potentials and a Gaussian distribution of electron tunnelling distances, but not by homogeneous Marcus–Hush theory. Comparison with experimental voltammetry obtained from a Fc-EPPG electrode, simulations using a distribution in formal potentials is found to achieve by far the best fit, albeit with a very large value of σ.

Acknowledgment

M.C.H. thank EPSRC for funding (EP/H002413/1), R.G. thank the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación for his Ph.D. Grant (BES-2007-15385 and EEBB-2011-44249).

References

[1] R.L. McCreery, Chem. Rev. 108 (7) (2008) 2646–2687.
[2] C.F. Blanford, F.A. Armstrong, J. Solid State Electrochem. 10 (10) (2006) 826–832.
[3] I. Dumitrescu, P.R. Unwin, N.R. Wilson, J.V. Macpherson, Anal. Chem. 80 (10) (2008) 3598–3605.
[4] C.C.M. Neumann, C. Batchelor-Mcauley, C. Downing, R.G. Compton, Chem. Eur. J. 17 (26) (2011) 7320–7326.
[5] C.E.D. Chidsey, Science 251 (1991) 919–922.
[6] J.F. Smalley, M.D. Newton, S.W. Feldberg, J. Electroanal. Chem. 589 (2006) 1–6.
[7] H.O. Finklea, L. Liu, M.S. Ravenscroft, S. Punturi, J. Phys. Chem. 100 (1996) 18852–18858.
[8] Q. Chi, J. Zhang, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup, J. Phys. Chem. B 105 (2001) 4669–4679.
[9] J. Yan, S. Dong, J. Li, W. Chen, J. Electrochem. Soc. 144 (1997) 3858–3865.
[10] J. Hirst, F.A. Armstrong, Anal. Chem. 70 (1998) 5062–5071.
[11] H.O. Finklea, D.D. Hanshew, J. Am. Chem. Soc. 114 (9) (1992) 3173–3181.
[12] M.S. Ravenscroft, H.O. Finklea, J. Phys. Chem. 98 (14) (1994) 3843–3850.
[13] P. Fristrup, M. Grubb, J. Zhang, H.E.M. Christensen, A.M. Hansen, J. Ulstrup, J. Electroanal. Chem. 511 (1–2) (2001) 28–133.
[14] J.N. Richardson, G.K. Rowe, M.T. Carter, L.M. Tender, L.S. Curtin, S.R. Peck, R.W. Murray, Electrochim. Acta 40 (10) (1995) 1331–1338.
[15] J.N. Richardson et al., J. Phys. Chem. 99 (2) (1995) 766–772.
[16] R.S. Ingram, R.W. Murray, J. Chem. Soc. Faraday Trans. 92 (20) (1996) 3941–3946.
[17] L. Tender, M.T. Carter, R.W. Murray, Anal. Chem. 66 (19) (1994) 3173–3181.
[18] G.K. Rowe, M.T. Carter, J.N. Richardson, R.W. Murray, Langmuir 11 (5) (1995) 1797–1806.
[19] A.L. Eckermann, J.A. Shaw, T.J. Meade, Langmuir 26 (4) (2010) 2904–2913.
[20] W.J. Albery, M.G. Boutelle, P.J. Colby, A.R. Hillman, J. Electroanal. Chem. 133 (1982) 135–145.
[21] M.J. Honeychurch, G.A. Rechnitz, Electroanalysis 10 (5) (1998) 285–293.
[22] M.J. Honeychurch, G.A. Rechnitz, Electroanalysis 10 (7) (1998) 453–457.
[23] E. Laviron, J. Electroanal. Chem. 105 (1) (1979) 25–34.
[24] Christopher P. Smith, Henry S. White, Anal. Chem. 64 (1992) 2398–2405.
[25] Lukáš Fojt, Stanislav Hasoň, J. Electroanal. Chem. 586 (2006) 136–143.
[26] Denis Menshykau, Ian Streeter, Richard G. Compton, J. Phys. Chem. C 112 (2008) 14428–14438.
[27] Denis Menshykau, Richard G. Compton, J. Phys. Chem. C 113 (2009) 15602–15620.
[28] Rama Kant, S.K. Rangarajan, J. Electroanal. Chem. 368 (1994) 1–21.
[29] Shailendra K. Jha, Abhishek Sangal, Rama Kant, J. Electroanal. Chem. 615 (2008) 180–190.
[30] Timothy R. Nolen, Peter S. Fedkiw, J. Electroanal. Chem. 258 (1989) 265–280.
[31] Derek S. Louch, Mark D. Pritzker, J. Electroanal. Chem. 319 (1991) 33–53.
[32] S.W. Feldberg, Anal. Chem. 82 (2010) 5176–5183.
[33] K.B. Oldham, J.C. Myland, J. Electroanal. Chem. 655 (1) (2011) 65–72.
[34] W.J. Royea, A.M. Fajardo, N.S. Lewis, J. Phys. Chem. B 101 (1997) 11152–11159.
[35] W.J. Royea, T.W. Hamann, B.S. Brunschwig, N.S. Lewis, J. Phys. Chem. B 110 (39) (2006) 19433–19442.
[36] P.P. Edwards, H.B. Gray, M.T.J. Lodge, R.J.P. Williams, Angew. Chem. Int. Ed. 47 (36) (2008) 6758–6765.
[37] D. Evrard, F. Lambert, C. Policar, V. Balland, B. Limoges, Chem. Eur. J. 14 (30) (2008) 9286–9291.
[38] J.P. Randin, E. Yeager, J. Electroanal. Chem. 58 (2) (1975) 313–322.
[39] Christian Amatore, Emmanuel Maisonhaute, Bernd Schöllhorn, Jay Wadhawan, ChemPhysChem 8 (2007) 1321–1329.
[40] Stephen W. Feldberg, Israel Rubinstein, J. Electroanal. Chem. 240 (1–2) (1988) 1–15.
[41] C.A. Coulson, R. Taylor, Proc. Phys. Soc. 65 A (1952) 815–825.
[42] A.R. Ubbelohde, Proc. R. Soc. Lond. A 327 (1972) 289–303.
[43] L. Edman, B. Sundqvist, E. McRae, E. Litvin-Staszewska, Phys. Rev. B 57 (1998) 6227–6230.
[44] D.A. Fischer, R.M. Wentzcovitch, R.G. Carr, A. Continenza, A.J. Freeman, Phys. Rev. B 44 (1991) 1427–1429.

9.2.3 Oxidation of Fc-modified electrode in alkyl cyanides

The Marcus theory potentially fills this gap by applying the theory of spectroscopic, radiationless electronic transitions to electron transfer reactions between molecules. In the classical Marcus theory the Gibbs energy surfaces are parabola and the transition state corresponds to the intersection of the parabolas, where the Franck–Condon and energy conservation principles are fulfilled [16, 31]. Later refinements of the theory on the basis of the "encounter pre-equilibrium" model pointed out an additional effect of the solvent reorientation dynamics on the value of the standard rate constant, beyond its contribution to the reorganisation energy (the so-called solvent "friction" effects) [20]. The rate constant (k_0) value, accounts for the facility of the electron transfer. We can relate this with the electrode material (through the density of electronic states,ρ) and the structural changes in the solution-phase molecules and its surrounding (through the reorganization energy,λ). The λ is related to the curvature of the free energy curves and it corresponds to the energy required to distort the atomic configurations of the reactant and its solvation shell to those of the equilibrium product state in the absence of electron transfer. Two contributions to λ can be separated, one from the changes in the intramolecular vibrations (the inner-sphere re-organisation energy, λ_i) and the other from the changes in solvent orientation coordinates (the outer-sphere reorganisation energy, λ_o):

Thus, the heterogeneous rate constant (k_0) is affected by the solvent reorientation dynamics such that, in limit of weak overlap and assuming $\lambda_0 >> \lambda_i$, k_0 is inversely proportional to the longitudinal dielectric relaxation time (τ_L^{-1}). This variation of k_0 with τ_L^{-1} has been often studied by measuring the electron-transfer rate of a given process in different solvents. The decrease of the k_0 value with τ_L^{-1} has been verified concerning outer-sphere heterogeneous electron transfers from the electro-oxidation of Fc derivatives [32,33] in a wide range of solvents and solvent mixtures.

From the theoretical k_0 *vs.* τ_L^{-1}dependence it can also be inferred that the value of the heterogeneous rate constant must decrease when the viscosity of the solution increases, which is directly related with the dielectric relaxation time. This behaviour has been observed experimentally from the electrochemical behaviours of the redox couples $[Cr(EDTA)]^{-}/^{2-}$, $[Fe(CN)6]^{3-}/^{4-}$ at solutions with different viscosities [34, 35,36].

The redox process of Fc-EPPG modified electrodes were studied by CV in different alkyl cyanide media, in the solvents: acetonitrile (MeCN), butyronitrile (PrCN) and valeronitrile (BuCN) as shown in Figure 9.7a-c. As it can be observed, there is a shift in the E_p for the different solvent and wider ΔE for the most viscose solvent with the higher scan rates (υ). Considering the ΔE minimum as the formal potential for the surface bound Fc in each solvent (E^o) and subtracting the E_p in each process and plotting this against log υ (points in Figures 9.2.4 d-f), it is possible to make a rough estimation of the k_0 (tentative values shown as lines in Figures 9.7 d-f). Unfortunately, the surface bound Fc does not seem to be stable in the different alkyl cyanides which cause high dispersion of values and error in the estimation of k_0.

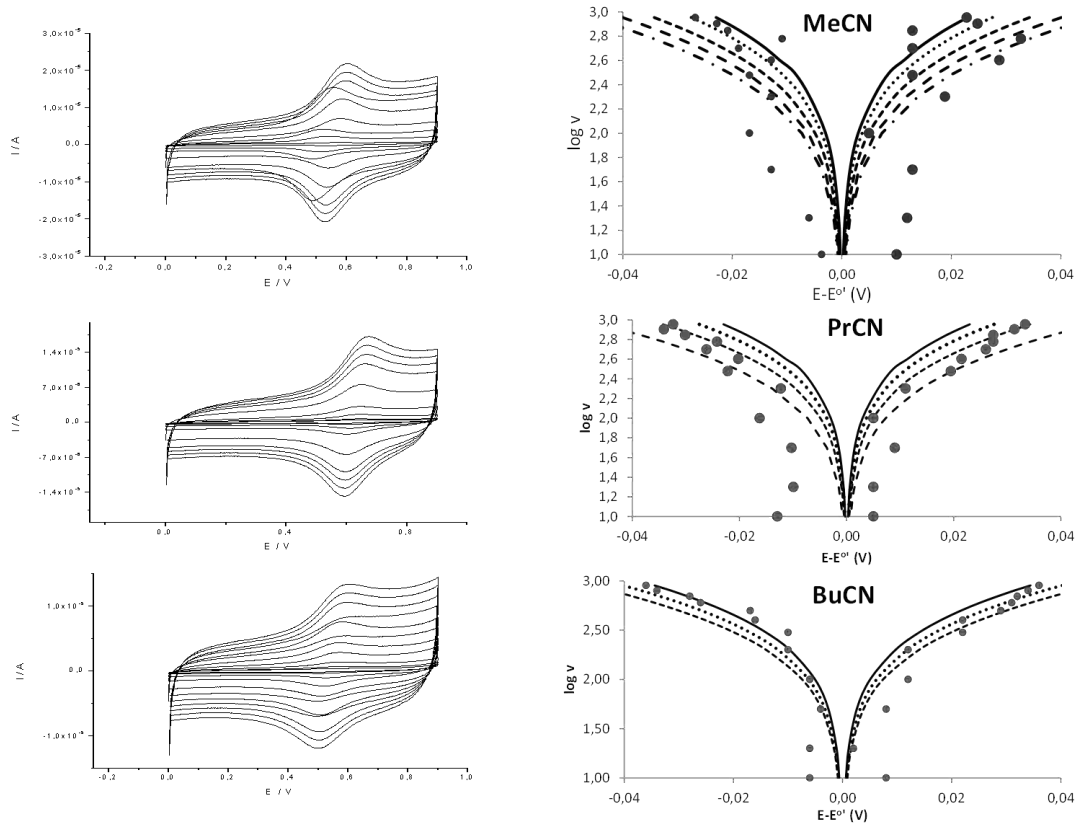


Figure 9.7 – Left: Cyclic voltammograms of a Fc-modified EPPG electrode ($\Gamma \sim 1$ nmol cm^{-2}) for sweep rates varying from 10-800 mV s^{-1} in different alkyl cyanides: MeCN, PrCN and BuCN. Right: log υ vs. E_p-Eº for the oxidation of Fc-modified EPPG electrode in different solvent. Points represent the estimation of the overpotential (Ep-Eº) in each sweep rate. Lines represent the theoretical estimation of the rate constant for a one electron transfer reaction (k_0).

If a compound undergoes a purely outer-sphere electron transfer, the measured k_0 values should scale with the τ_L^{-1} (MeCN = 0.20 ps, EtCN = 0.31 ps, PrCN = 0.52 ps, BuCN = 0.74 ps) [37]. Plotting the k_0 values measured in against these we do not obtain a linear plot with zero intercept as the one it is usual for Fc in solution [32], but there is a clear decrease of the rate of electron transfer in the different alkyl cyanides on the longitudinal dielectric relaxation times of the solvents in accordance with solvent dynamic theory. The k_0 values measured in the different solvents show slower diffusion of Fc in solution with increasing alkyl chain length of the solvent, correlating with increasing viscosity [34]. As for a surface bound species, there must be other contributions because in the representation of k_0 bound Fc *vs.* k_0 Fc solution it is not possible to establish a linear plot with a unitary slope. To clarify and have a better estimation of k_0, it would be useful to make measures in a solvent with an intermediate viscosity with respect to MeCN and PrCN (*eg.* propionitrile, EtCN), because variation for PrCN and BuCN are very subtiles.

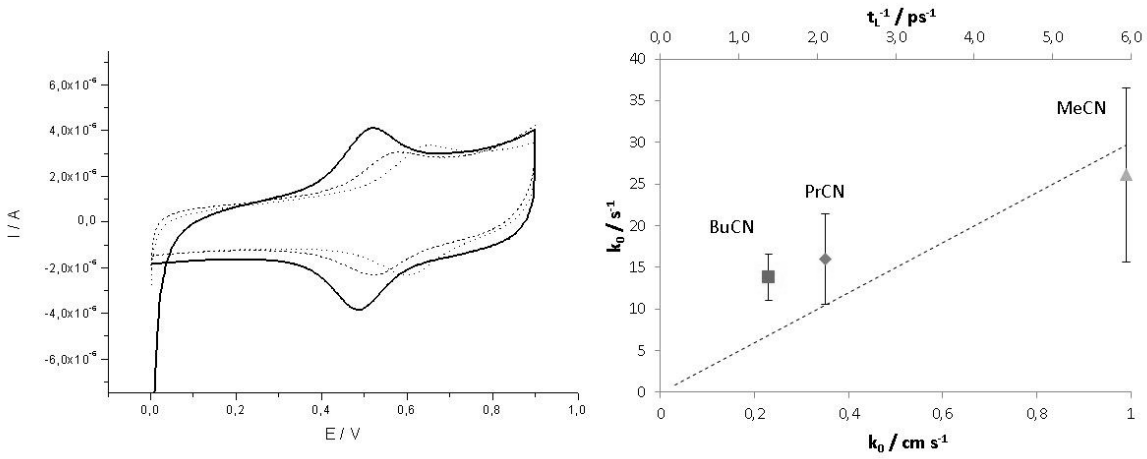


Figure 9.8 – Left: Cyclic voltammograms of a Fc-modified EPPG electrode ($\Gamma \sim 1$ nmol cm^{-2}) in different alkyl cyanides: MeCN (–), PrCN (--) and BuCN (¨). Right: k_0 vs. τ_L^{-1} for the oxidation of Fc-modified EPPG electrode in different solvent. k_0 is the standard heterogeneous rate constant and is expressed in s^{-1} for the surface bound Fc and cm s^{-1} for the Fc in solution [32]; τ_L^{-1} is the longitudinal dielectric relaxation time of the solvent.

9.2.4. Analytical performance for Cys determination

The modified electrodes were tested as a sensor for the presence of thiols at physiological pH. When an anodic potential is applied, the thiol in solution chemically reduces back the newly formed Fc moiety such that it can be regenerated at the electrode surface, thereby producing an enhancement in the oxidative current (Figure 9.9). This voltammetric response is entirely consistent with the soluble Fc undergoing an electrocatalytic reaction process [1, 38, 39]. These results are analogous to that observed previously for the electrocatalytic reaction of sulfide with ferricyanide [40, 41].

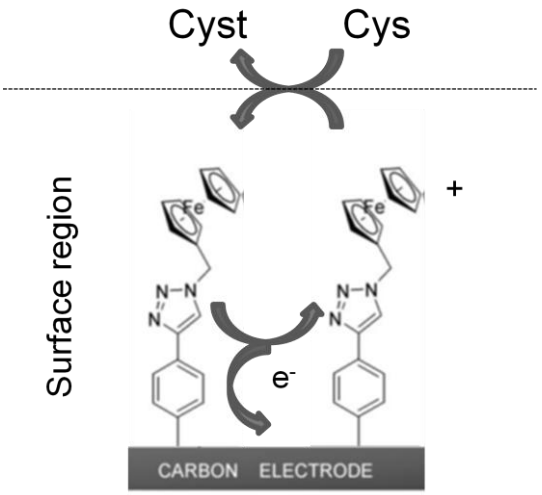


Figure 9.9 – Schematic representation of the electrocatalytic oxidation of Cys at Fc-EPPG.

Figure 9.10a details the CV of the Fc-EPPG in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), towards increasing additions of Cys (0–200 nM). Upon the addition of Cys to the solution an increase in the oxidative peak current is observed at +0.41 V over the entire concentration range studied, with a corresponding decrease in the reductive current at +0.35 V. SWV allowed a better following of the catalytic response of the modified electrode (Figure 9.10b), obtaining a linear range over the concentration 10–50 nM (Figure 9.10c) which demonstrates that the optimization of experimental conditions could make this modification an interesting sensor for thiols.

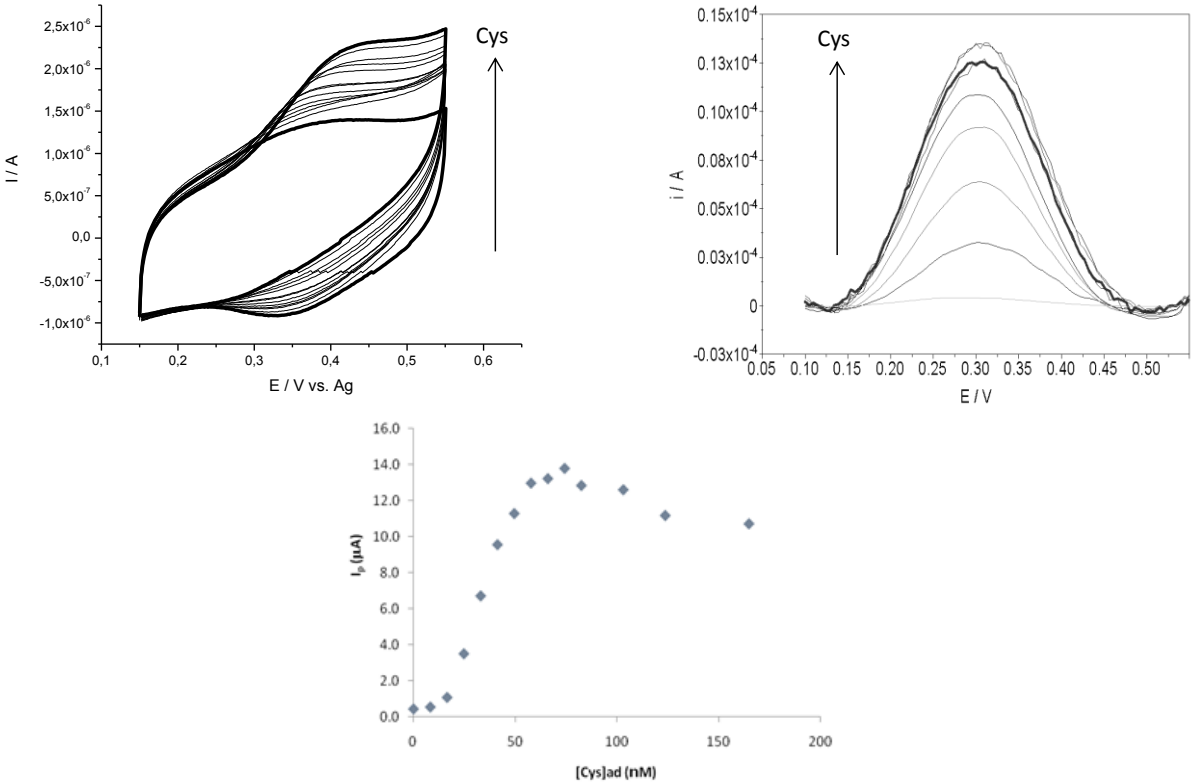


Figure 9.10 – Plot of electrocatalytic peak currents obtained from successive Cys additions to solution by CV (left) and SWV (right) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4). Plot of the electrocatalytic oxidation peak currents (SWV) *vs.* added Cys concentration (bottom center).

9.3 Conclusions

We investigated the effect of inhomogeneous electrode surfaces with a study on the voltammetry of a Fc-modified EPPG electrode. After modification of the graphite surface using ‘click’ chemistry the system was characterised using cyclic voltammetry: the peak width was found to be much larger than expected for an ‘ideal’ monolayer and the peak current much too small. The use of the MHC kinetic model for the modelisation of electrode kinetics has been examined. Analogously to the widely used BV approach, MHC is a three-parameter

model with the reorganisation energy, the standard rate constant and the formal potential as adjustable parameters. It has the advantage over the BV model that the kinetic parameters have an evident connection with the physical and chemical properties of the system. Since fitting was not possible using either BV or MHC models they attempted to model the kinetic dispersity using a Gaussian distribution of formal potential and a Gaussian distribution of electron tunneling distance. Both models had the desired effect of widening the voltammetric wave, but achieved this in qualitatively different ways. The distribution of formal potentials broadened the wave symmetrically, whereas the distribution in tunneling distances produced a fairly sharp peak with a 'tail' which extended to large values of overpotential. Comparison of both models with the experimental data revealed that, despite its simplicity, the distribution of formal potentials was able to accurately reproduce the experimental wave shape, peak height and peak separation over a range of scan rates.

The redox process of Fc-EPPG modified electrodes were studied by CV in different alkyl cyanide media where k_0 values measured show slower electrode process with increasing alkyl chain length of the solvent, correlating with increasing viscosity. The modified electrodes were tested as a sensor for the presence of thiols (Cys) at physiological pH by SWV. A catalytic voltammetric response was observed for low Cys concentrations, but the modification needs further improvements in order to reach a stable and reproducible signal.

9.4 References

1. White, P. C.; Lawrence, N. S.; Davis, J.; Compton, R. G., *Electroanalysis* **2002,** *14* (2), 89-98.
2. Harfield, J. C.; Batchelor-McAuley, C.; Compton, R. G., *Analyst* **2012,** *137* (10), 2285-2296.
3. O'Shea, T. J.; Lunte, S. M., *Analytical Chemistry* **1994,** *66* (2), 307-311.
4. Cataldi, T. R. I.; De Benedetto, G. E.; Bianchini, A., *Electroanalysis* **1998,** *10* (17), 1163-1167.
5. Nalini, B.; Sriman Narayanan, S., *Electroanalysis* **1998,** *10* (11), 779-783.
6. Shi, G.; Lu, J.; Xu, F.; Sun, W.; Jin, L.; Yamamoto, K.; Tao, S.; Jin, J., *Analytica Chimica Acta* **1999,** *391* (3), 307-313.
7. Banks, C. E.; Compton, R. G., *Analyst* **2006,** *131* (1), 15-21.
8. Pumera, M., *Chemical Society Reviews* **2010,** *39* (11), 4146-4157.
9. Tasis, D.; Tagmatarchis, N.; Bianco, A.; Prato, M., *Chemical Reviews* **2006,** *106* (3), 1105-1136.
10. Banks, C. E.; Crossley, A.; Salter, C.; Wilkins, S. J.; Compton, R. G., *Angewandte Chemie International Edition* **2006,** *45* (16), 2533-2537.
11. Pumera, M., *Chemical Record* **2012,** *12* (1), 201-213.
12. Sekioka, N.; Kato, D.; Ueda, A.; Kamata, T.; Kurita, R.; Umemura, S.; Hirono, S.; Niwa, O., *Carbon* **2008,** *46* (14), 1918-1926.
13. Salimi, A.; Pourbeyram, S., *Talanta* **2003,** *60* (1), 205-214.
14. Inoue, T.; Kirchhoff, J. R., *Analytical Chemistry* **2000,** *72* (23), 5755-5760.
15. Griveau, S.; Gulppi, M.; Pavez, J.; Zagal, J. H.; Bedioui, F., *Electroanalysis* **2003,** *15* (9), 779-785.

16. Compton, R. G.; Banks, C. E., *Understanding Voltammetry*. Imperial College Press: London, 2011.

17. Marcus, R. A.; Sutin, N., *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **1985,** *811* (3), 265-322.

18. Fletcher, S., *Journal of Solid State Electrochemistry* **2010,** *14* (5), 705-739.

19. Hush, N. S., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999,** *470* (2), 170-195.

20. Weaver, M. J., *Chemical Reviews* **1992,** *92* (3), 463-480.

21. Calef, D. F.; Wolynes, P. G., *The Journal of Physical Chemistry* **1983,** *87* (18), 3387-3400.

22. Henstridge, M. C.; Laborda, E.; Rees, N. V.; Compton, R. G., *Electrochimica Acta* **2012,** *in press*.

23. Amatore, C.; Maisonhaute, E.; Schöllhorn, B.; Wadhawan, J., *ChemPhysChem* **2007,** *8* (9), 1321-1329.

24. Hush, N. S., *The Journal of Chemical Physics* **1958,** *28* (5), 962-972.

25. Devadoss, A.; Chidsey, C. E. D., *Journal of the American Chemical Society* **2007,** *129* (17), 5370-5371.

26. Decreau, R. A.; Collman, J. P.; Hosseini, A., *Chemical Society Reviews* **2010,** *39* (4), 1291-1301.

27. Kolb, H. C.; Finn, M. G.; Sharpless, K. B., *Angewandte Chemie International Edition* **2001,** *40* (11), 2004-2021.

28. Rostovtsev, V. V.; Green, L. G.; Fokin, V. V.; Sharpless, K. B., *Angewandte Chemie International Edition* **2002,** *41* (14), 2596-2599.

29. Davies, M. B., *Polyhedron* **1992,** *11* (3), 285-321.

30. Evrard, D.; Lambert, F.; Policar, C.; Balland, V.; Limoges, B., *Chemistry – A European Journal* **2008,** *14* (30), 9286-9291.

31. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods. Fundamental and Applications*. Wiley: New York, 2001.

32. Clegg, A. D.; Rees, N. V.; Klymenko, O. V.; Coles, B. A.; Compton, R. G., *Journal of Electroanalytical Chemistry* **2005,** *580* (1), 78-86.

33. Baranski, A. S.; Winkler, K.; Fawcett, W. R., *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **1991,** *313* (1–2), 367-375.

34. Clegg, A. D.; Rees, N. V.; Klymenko, O. V.; Coles, B. A.; Compton, R. G., *Journal of the American Chemical Society* **2004,** *126* (19), 6185-6192.

35. Zhang, X.; Leddy, J.; Bard, A. J., *Journal of the American Chemical Society* **1985,** *107* (12), 3719-3721.

36. Zhang, X.; Yang, H.; Bard, A. J., *Journal of the American Chemical Society* **1987,** *109* (7), 1916-1920.

37. Krishnaji; Mansingh, A., *The Journal of Chemical Physics* **1964,** *41* (3), 827-831.

38. Raoof, J.; Ojani, R.; Kolbadinezhad, M., *Journal of Solid State Electrochemistry* **2009,** *13* (9), 1411-1416.

39. Lawrence, N. S.; Tustin, G. J.; Faulkner, M.; Jones, T. G. J., *Electrochimica Acta* **2006,** *52* (2), 499-503.

40. Nekrassova, O.; Allen, G. D.; Lawrence, N. S.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G., *Electroanalysis* **2002,** *14* (21), 1464-1469.

41. Lawrence, N. S.; Thompson, M.; Prado, C.; Jiang, L.; Jones, T. G. J.; Compton, R. G., *Electroanalysis* **2002,** *14* (7-8), 499-504.

Appendix 1

A.1 Butler-Volmer Kinetics

Consider a simple one electron transfer reaction:

$$O + ne^- \underset{k_b}{\overset{k_f}{\rightleftharpoons}} R \qquad \text{(A1.1)}$$

the electrode kinetic can be modelled similarly to homogeneous reaction kinetics using a transition state model where the reactant needs to overcome an energy barrier before going to the product. The rate constant k can be expressed in term of the activation energy ΔH_{act} by the Arrhenius equation as:

$$k = A\exp\left(-\frac{\Delta H_{act}}{RT}\right) \qquad \text{(A1.2)}$$

where A is an pre-exponential factor that can be expressed in term of the activation entropy ΔS_{act} as:

$$A = A^{'}\exp\left(-\frac{\Delta S_{act}}{R}\right) \qquad \text{(A1.3)}$$

by combining equation A1.1 and A1.2, it is clear that the reaction kinetics depends on the activation free energy in the relationship:

$$k = A'\exp\left(\frac{-(\Delta H_{act} - T\Delta S_{act})}{RT}\right) = A'\exp\left(\frac{-\Delta G^{\neq}}{RT}\right) \qquad \text{(A1.4)}$$

where $\Delta G^{\neq}$ is the free energy of activation which depends on the applied potential. From interpreting figure A1.1, the transition state is located at the cross of the curves, if the potential is changed by ΔE, the new value E, the relative energy of the electron on the electrode changes by $-F\Delta E = -F(E - E_f^{\varnothing})$, hence the curve correspond to O + e$^-$ moves up (negative ΔE) and down (positive ΔE) by that amount.

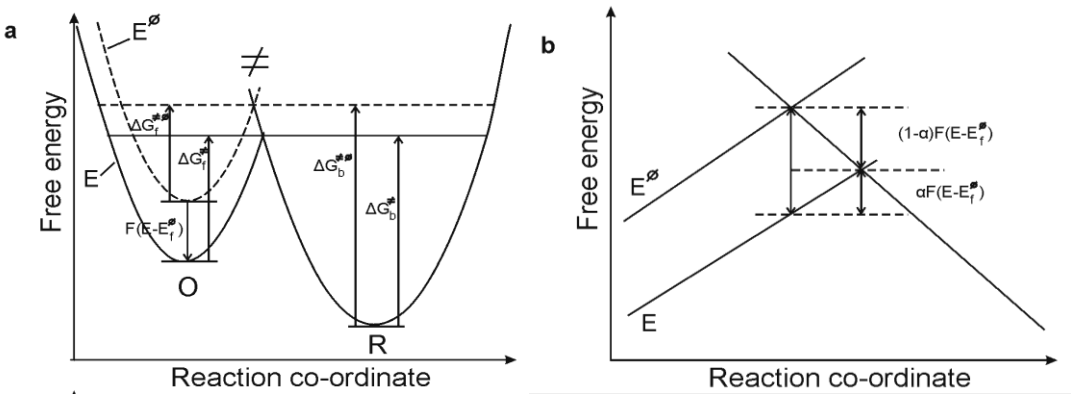


Figure A1.1 – a) Effects of potential change on the standard free energies of activation for oxidation and reduction for an on electron transfer reaction, where O is the bulk reactant and R is the bulk product. b) magnified picture of box area in the upper frame.

It is apparent that by applying a positive potential, the barrier of oxidation $\Delta G_b^{\neq}$ is now less then $\Delta G_b^{\neq\varnothing}$ by a fraction of total energy change 1-α, where α is the transfer coefficient which takes value between 0-1. Therefore:

$$\Delta G_b^{\neq} = \Delta G_b^{\neq\varnothing} - (1-\alpha)F(E - E_f^{\varnothing}) \quad \text{(A1. 5)}$$

on the same time, the barrier for the reduction $\Delta G_f^{\neq}$ is now higher than $\Delta G_f^{\neq\varnothing}$ by $\alpha F(E - E_f^{\varnothing})$ and therefore,

$$\Delta G_f^{\neq} = \Delta G_f^{\neq\varnothing} + \alpha F(E - E_f^{\varnothing}) \quad \text{(A1. 6)}$$

assume the rate constant takes the Arrhenius form, combining equation A1.14 and 4.16 for both the oxidation and the reduction process, gives:

$$k_b = A'_b \exp(-\Delta G_b^{\neq\varnothing} / RT) \exp\left((1-\alpha)\mathrm{f}(\mathrm{E} - \mathrm{E}_\mathrm{f}^{\varnothing})\right) \quad \text{(A1. 7)}$$

$$k_f = A'_f \exp(-\Delta G_f^{\neq\varnothing} / RT) \exp(-\alpha\mathrm{f}(\mathrm{E} - \mathrm{E}_\mathrm{f}^{\varnothing}) \quad \text{(A1. 8)}$$

where f = $\frac{F}{RT}$. At equilibrium, $k_f[O] = k_b[R]$ and $E = E_f^{\varnothing}$ so that $k_f = k_b$. Thus, at $E_f^{\varnothing}$, the rate constant of both forward and backward reaction takes the same value and is called the standard rate constant k_0 where k_f and k_b can be expressed as:

$$k_f = k_0 \exp\left(-\alpha\mathrm{f}(\mathrm{E} - \mathrm{E}_\mathrm{f}^{\varnothing})\right) \quad \text{(A1. 9)}$$

$$k_b = k_0 \exp\left((1-\alpha)\mathrm{f}(\mathrm{E} - \mathrm{E}_\mathrm{f}^{\varnothing})\right) \quad \text{(A1.10)}$$

The total current passed I ($I = FAk[X]$) at the electrode surface results from the difference between the forward and backward processes: $I = I_f - I_b$, by substituting in the relevant equations:

$$I = FAk_0\left[C_R(0,t)e^{(1-\alpha)f(E-E^{0'})} - C_O(0,t)e^{-\alpha f(E-E^{0'})}\right] \quad \text{(A1.11)}$$

which forms the Butler-Volmer equation stated in chapter 1, where f = $\frac{F}{RT}$ and C_R and C_O are the concentration of the reduced and oxidised species at the electrode surface respectively.

A.2 Marcus-Hush-Chidsey theory of electron transfer applied to voltammetry

Theory to model the kinetics of chemical reactions where electrons are transferred, without formation or rupture of chemical bonds, has been the subject of intensive efforts over many years. In general, the most treatments employ transition-state formalism such that the reaction progresses on a Gibbs energy surface from the configuration of the reactant to that of the product and the general expression for the rate constants is given by an Arrhenius-like relationship.

In this work we consider the case of a heterogeneous electron transfer between an electrode and an electroactive species either in solution or attached to the electrode:

$$O+e^- \rightleftharpoons R \qquad (A2.1)$$

where O is the oxidized species which is reduced to R. For interfacial electron transfer processes, the electron transfers either to or from a metal electrode and we can vary the activation energy of the process, and therefore its rate, by varying the value of the applied potential, E (see Fig. A2.1).

In the classical Butler–Volmer (BV) model (Fig. A2.1A), the transition state is assumed to have a potential dependence intermediate to those of the reactant and product. This is parameterised by the transfer coefficient, $0 < \alpha < 1$, such that a value of 0 corresponds to a 'reactant-like' transition state and a value of 1 means a 'product-like' transition state.

The Marcus theory potentially fills this gap by applying the theory of spectroscopic, radiationless electronic transitions to electron transfer reactions between molecules. In the classical Marcus theory the Gibbs energy surfaces are parabolae (Fig. A2.1B) and the transition state corresponds to the intersection of the parabolas, where the Franck–Condon and energy conservation principles are fulfilled. In this case the parameters that define the activation barrier are the reaction Gibbs energy ($\Delta G°$) and the reorganisation energy (λ).

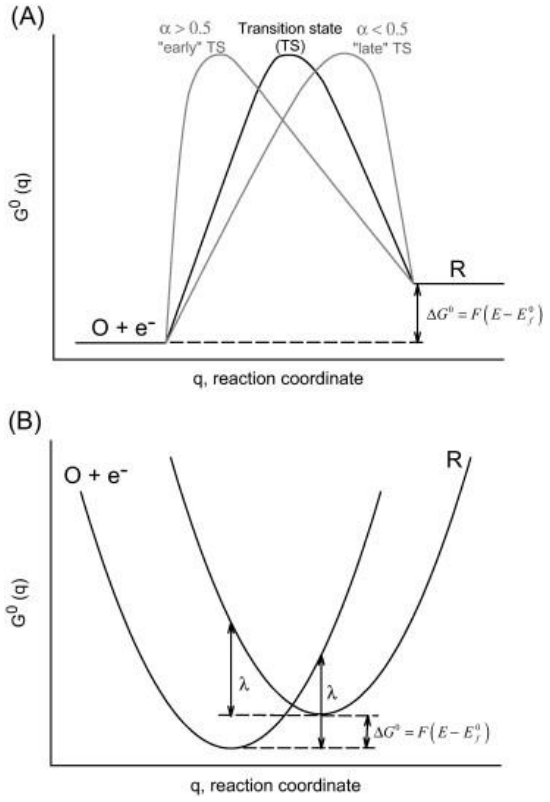


Figure A2.1 – Gibbs energy curves as a function of the reaction coordinate for an electron transfer reaction according with the (A) Butler-Volmer and (B) Marcus-Hush-Chidsey models.

The reorganisation energy is related to the curvature of the free energy curves and it corresponds to the energy required to distort the atomic configurations of the reactant and its solvation shell to those of the equilibrium product state in the absence of electron transfer. Two contributions to λ can be separated, one from the changes in the intramolecular vibrations (the inner-sphere reorganisation energy, λ_i) and the other from the changes in solvent orientation coordinates (the outer-sphere reorganisation energy, λ_o):

The standard rate constant (k_0) according to the classical Marcus model is given by:

- Solution-phase redox couple

$$k_0 = \frac{(2\pi)^2 \rho H_{DA}^{0^2}}{\beta h \sqrt{4\pi\Lambda}} \exp\left[-\frac{\Lambda}{4}\right] I(0, \Lambda) \qquad \text{(A2.2)}$$

- Monolayer redox couple

$$k_0 = \frac{(2\pi)^2 \rho H_{DA}^{0^2}}{h \sqrt{4\pi\Lambda}} \exp[-\beta(r_a - r_0)] \exp\left[-\frac{\Lambda}{4}\right] I(0, \Lambda) \qquad \text{(A2.3)}$$

with r_a the distance between the electrode surface and the attached redox couple and r_0 the distance of the closest approach.

The k_0 value, at least in principle, accounts for the facility of the electron transfer. From the above expressions we can relate this with the electrode material (through the density of electronic states, ρ) and the structural changes in the solution-phase molecules and its surrounding (through the reorganisation energy,λ). In addition, the model also accounts for the distance dependence of the electron transfer, $H_{DA}^{0^2}$ being the electronic coupling matrix for the closest distance between the electrode and the electroactive molecule, and β the electronic coupling attenuation coefficient associated to this dependence.

Later refinements of the theory on the basis of the “encounter pre-equilibrium” model pointed out an additional effect of the solvent reorientation dynamics on the value of the standard rate constant, beyond its contribution to the reorganisation energy (the so-called solvent “friction” effects). Thus, the heterogeneous rate constant is affected by the solvent reorientation dynamics such that, in limit of weak overlap and assuming $\lambda_o \gg \lambda_i$, k_0 is inversely proportional to the longitudinal dielectric relaxation time (τ_L^{-1}).

$$k_0 \propto \tau_L^{-1} \qquad \text{(A2.4)}$$

This variation of k_0 with τ_L^{-1} has been often studied by measuring the electron-transfer rate of a given process in different solvents.

A.3 References

1 Bard, A. J.; Faulkner, L. R.; *Electrochemical Methods Fundamentals and Applications 2nd Edition,* John Wiley and Sons, Inc., **2001**.

2 Marcus, R. A.; Sutin, N.,. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* **1985,** *811* (3), 265-322.

3 Henstridge, M. C.; Laborda, E.; Rees, N. V.; Compton, R. G., *Electrochimica Acta* **2012**, *in press***.**

Parte IV

Conclusiones

Conclusiones

Las principales conclusiones derivadas de los diferentes estudios realizados a lo largo de esta Tesis son:

1. La combinación de DPP y MCR-ALS ha permitido obtener información valiosa sobre la competición entre diferentes péptidos de cadena corta con un solo grupo tiol en la complejación de metales pesados. En el modelo considerado para Cys/Cys-Gly/Cd: i) no se han encontrado evidencias de complejos mixtos que incluyan diferentes ligandos, y ii) se observa un rápido equilibrio de intercambio del metal entre los ligandos, ya que el corto periodo de tiempo entre adiciones consecutivas es suficiente para desplazar el metal y formar el complejo que *a priori* parecía más estable.
2. Para los sistemas constituidos por una fitoquelatina y un fragmento que contiene un grupo tiol (Cys-Gly/PC_2; Cys/PC_3) en presencia de Cd^{2+}, los resultados evidencian que los péptidos de cadena más larga que contienen más grupos tiol desplazan fácilmente a los péptidos de cadena más corta de sus complejos metálicos, y también que este desplazamiento es muy rápido, ya que el equilibrio se alcanza en los pocos minutos que transcurren entre adición y adición.
3. La información complementaria de ESI-MS confirma la presencia en ambos sistemas de la mayoría de especies detectadas voltamperométricamente. En el caso de la mezcla Cd^{2+}-PC_2-Cys-Gly, ESI-MS detecta también algunos complejos mixtos. Esto puede significar que dichas especies: i) existen en disolución a concentraciones muy bajas, no detectables por voltamperometría; ii) se detectan por voltamperometría, pero sus señales están tan próximas a las de las especies mayoritarias que no pueden distinguirse de las mismas; o iii) no existen en disolución, sino que se crean durante el proceso de ionización en ESI-MS. Como la hipótesis i) parece ser la más correcta, la cuestión es por qué los complejos mixtos no se estabilizan como una etapa intermedia en la sustitución de los ligandos de cadena corta por los de cadena más larga. Esto podría estar relacionado con factores estéricos o con la tendencia de algunos péptidos tiólicos a unir dos moléculas de cadena larga en el enlace a varios iones metálicos. Sería necesario recurrir a experimentos con técnicas complementarias para resolver esta cuestión.
4. En el enlace competitivo de fitoquelatinas con Cd^{2+}, cuando n≤3, los péptidos de cadena larga (con valores de n mayores) desplazan fácilmente a los iones Cd^{2+} de sus complejos con moléculas de cadena corta y los nuevos complejos parecen ser más estables, como sugieren los potenciales de pico más negativos de sus señales de reducción. Tal y como se esperaba, el proceso inverso (es decir, el

desplazamiento de los iones metálicos desde los ligandos de cadena larga hasta aquellos de cadena corta) no se observa.

5. Cuando n≥3 la forma y posición de las señales de los complejos metálicos de las diferentes PC_n se vuelven muy parecidas y esto sugiere que dichos complejos también serían parecidos. En consecuencia, el enlace del ion metálico con péptidos de cadena más larga estaría más determinado por la naturaleza de las posiciones de complejación por separado que por el conjunto de la molécula. Esto también podría relacionarse con el hecho de que para n≥4 el número de grupos tiol del péptido puede "saturar" el número de coordinación del Cd^{2+} (típicamente tetraédrico). De todas formas, la mencionada coincidencia en las posiciones de las señales ha impedido un estudio riguroso del intercambio del ion metálico entre péptidos con n≥3.
6. En todos los casos, el incremento de n produce un incremento del número de iones metálicos que pueden unirse a una fitoquelatina. Esto podría significar que cuando se añade un gran exceso de iones metálicos estos se enlazan por un número mínimo de grupos tiol, luego la cantidad de iones que puede enlazarse dependería de la cantidad de grupos tiol.
7. La metodología propuesta, es decir la combinación de análisis quimiométrico (MCR-ALS, GPA, *pHfit*) voltamperométrico y espectroscópico complementada con resultados de ESI-MS, ha mostrado un gran potencial para extraer información valiosa del sistema $Cd^{2+}/Pb^{2+}/PC_5$, gracias sobre todo el contraste de técnicas experimentales muy diferentes que proporcionan puntos de vista complementarios. Los excelentes resultados obtenidos sugieren que estrategias similares podrían aplicarse con éxito a sistemas inorgánicos complejos cuyos bajos niveles de concentración impidan la utilización de técnicas convencionales de análisis estructural.
8. La utilización de ITC, espectroscopía CD y voltamperometría (en modo DPP) apoyadas por algunos métodos quimiométricos desarrollados recientemente, como GPA, ha permitido investigar las propiedades complejantes de metales de SeCyst en un amplio intervalo de pH. No se han encontrado evidencias electroquímicas de complejos metálicos con Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} ni Pb^{2+}. En cambio, SeCyst forma complejos electroinactivos con Co^{2+} y Ni^{2+}, y complejos electroactivos y cinéticamente inertes con Cd^{2+} y Zn^{2+}. En el caso de Zn-SeCyst, se ha caracterizado un proceso de reducción irreversible.
9. Las valoraciones calorimétricas de SeCyst con Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, y Zn^{2+} producen curvas que se ajustan razonablemente al modelo de una sola posición complejante (*one set of sites*) que indica la formación de complejos estables 1:1 M(SeCyst). La excepción parece ser el caso del mercurio, donde otros procesos

afectan la curva ITC, con lo cual los parámetros ajustados son puramente tentativos. El orden de la constante de complejación de SeCyst con los iones metálicos estudiados es Hg^{2+}>Cd^{2+}~Zn^{2+}>Ni^{2+} >Co^{2}

10. El comportamiento de SeCyst en sistemas competitivos se ha estudiado mediante dos casos modelo: *i)* enlace competitivo de Zn^{2+} y Cd^{2+} con SeCyst, y *ii)* enlace competitivo de SeCyst y glutatión (GSH) con Cd^{2+}. La comparación de las propiedades del enlace diseleniuro con un tiol biológicamente importante como GSH es particularmente interesante. En el primer caso, la presencia de dos componentes activos en CD, apoyada por resultados de DPP, permite proponer la formación del complejo mixto ZnCd(SeCyst). En el segundo caso, no se han observado interacciones entre GSH y SeCyst, tal y como ha mostrado la separación de los picos electroquímicos respectivos. Cuando se añade SeCyst a Cd^{2+}:GSH, SeCyst desplaza el GSH de sus complejos de Cd^{2+} (especialmente $Cd(GSH)_2$) produciendo otros más estables. Además, los datos electroquímicos sugieren que no se forman complejos mixtos con diferentes ligandos. En resumen, el uso combinado de varias técnicas basadas en principios totalmente diferentes ha permitido obtener una detallada descripción de los sistemas estudiados.
11. Se han comparado dos modelos diferentes de inhomogeneidad de la superficie del electrodo con la teoría de Marcus–Hush para una superficie homogénea y con los resultados experimentales. El modelo MHC se ha utilizado para parametrizar las reacciones redox de las especies enlazadas a la superficie y en este aspecto ha sido razonablemente satisfactorio. En cambio, las superficies inhomogéneas muestran un cierto intervalo de velocidades de reacción y, según se ha demostrado, producen representaciones ln(i) vs. t no lineales. A pesar de que esto hace mucho más difícil la extracción de datos cinéticos, dichos datos se han podido obtener.

Conclusions

Les principals conclusions que es deriven dels estudis realitzats en aquesta Tesi Doctoral es poden resumir en els següents punts:

1. La combinació de DPP i MCR-ALS ha donat informació molt valuosa sobre la competició entre diferents tiols (pèptids o aminoàcids) de cadena curta envers la complexació de metalls pesants. En el sistema model considerat, Cys/Cys-Gly/Cd: *i)* no hi ha evidència de la formació de complexos mixtos (amb dos lligands); i *ii)* l'equilibri en la reacció de bescanvi del metall entre els diferents lligands s'assoleix ràpidament, i el curt interval de temps entre dues addicions successives és suficient per desplaçar el metall i formar el complex *a priori* més estable.
2. Pels sistemes que inclouen una fitoquelatina i un fragment seu amb grup tiol (Cys-Gly/PC_2; Cys/PC_3) en presència de Cd^{2+}, els resultats mostren que el pèptid de cadena més llarga, i que conté més grups tiols, desplaça fàcilment els pèptids més curts de llurs complexos metàl·lics, i que aquest desplaçament és molt ràpid perquè l'equilibri s'assoleix dintre dels pocs minuts transcorreguts després de cada addició, i posterior agitació de la solució, abans de fer una nova mesura.
3. La informació complementària obtinguda per ESI-MS confirma la presència, en ambdós sistemes, de la majoria d'espècies detectades voltamperomètricament. En el cas de la mescla Cd^{2+}-PC_2-Cys-Gly, ESI-MS detecta també algunes poques espècies mixtes (amb més d'un lligand). Aquests resultats podrien significar que: *i)* aquestes espècies existeixen en solució a concentracions molt baixes, no detectables per voltamperometria; *ii)* aquestes espècies són detectables per voltamperometria, però llurs senyals són tan propers als de les espècies majoritàries que no poden ser distingits d'aquells; i *iii)* aquestes espècies no existeixen en solució sinó que són creades durant el procés de ionització en ESI-MS. Suposant que la hipòtesi *i)* fos la més probable, la pregunta seria per què els complexos mixtos (de lligand) no s'estabilitzen com una etapa intermèdia entre la substitució dels diversos lligands de cadena curta pel primer i el segon lligand de cadena més llarga? Això podria estar relacionat amb els efectes estèrics o amb la tendència d'alguns pèptids tiòlics a enllaçar dues molècules de cadena llarga mitjançant l'enllaç d'alguns ions metàl·lics. La resolució d'aquest problema requeriria de posteriors experiments amb tècniques complementàries.
4. En la complexació competitiva de fitoquelatines amb Cd^{2+}, per PC_n amb n≤3, els pèptids de cadena més llarga (aquells amb valors més elevats de n) fàcilment desplacen els ions Cd^{2+} de llurs complexos amb molècules de cadena més curta, i els nous complexos són més estables, com suggereixen els potencials de pic més

negatius dels seus senyals de reducció. Com era d'esperar, el procés invers no ha estat observat (i.e., el desplaçament dels ions metàl·lics des dels complexos amb pèptids de cadena llarga als de cadena curta).

5. Per PC_n amb n≥3 la forma i posició dels corresponents complexos metàl·lics de PC_n són molt similars, i això suggereix que la complexació dels metalls pels pèptids de cadena més llarga està més influenciada pel fet de què els llocs complexants siguin separats que per el conjunt de la molècula. Això també podria estar relacionat amb el fet de què per n≥4 el nombre de grups tiol en el pèptid pot saturar el nombre de coordinació del Cd^{2+} (típicament tetraèdric). En qualsevol cas, l'abans esmentada coincidència en les posicions dels senyals impedeix un estudi més rigorós dels bescanvis metàl·lics entre pèptids amb n≥3.
6. En tots els casos, l'augment de n produeix un increment del nombre dels ions metàl·lics que es poden enllaçar a les molècules de PC_n. Això pot significar que, quan s'afegeix un gran excés dels ions metàl·lics, aquests són enllaçats per un nombre mínim de grups tiol, de manera que la quantitat de metalls que poden ser enllaçats depèn de la quantitat de grups tiol.
7. La metodologia proposada, *i.e.*, la combinació de l'anàlisi quimiomètrica (MCR-ALS, GPA, *pHfit*) de les dades voltamperomètriques i espectroscòpiques amb els resultats de ESI-MS, ha demostrat una gran capacitat per a l'obtenció d'informació molt valuosa del sistema $Cd^{2+}/Pb^{2+}/PC_5$, especialment perquè el contrast de tècniques experimentals molt diferents aporta punts de vista complementaris. Els resultats obtinguts suggereixen que una estratègia similar podria ser aplicable a molts sistemes bioinorgànics complexos en els que les baixes concentracions en què hipotèticament es puguin trobar puguin impedir l'ús de les tècniques de determinació estructural més convencionals
8. L'ús de la calorimetria (ITC), de l'espectroscòpìa de CD i de la voltamperometria (en la seva variant DPP) assistits per alguns mètodes quimiomètrics desenvolupats molt recentment, com GPA, ha permès investigar les propietats complexants de metalls de SeCyst dins d'un ampli interval de pH. No es van trobar evidències electroquímiques de la formació de complexos metàl·lics amb Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} i Pb^{2+}. Contràriament, SeCyst forma complexos electroinactius amb Co^{2+} i Ni^{2+}, i complexos cinèticament inerts, però electroactius, amb Cd^{2+} i Zn^{2+}. Per Zn-SeCyst es va caracteritzar un procés de reducció irreversible.
9. Les valoracions calorimètriques (ITC) de SeCyst amb Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, i Zn^{2+} van produir corbes que s'ajusten raonablement bé al model "*one set of sites*" per la formació de complexos 1:1 M(SeCyst) estables. El mercuri sembla ser l'excepció perquè hi ha altres processos presents que afecten les corbes ITC i, com a

conseqüència, els valors dels paràmetres ajustats són només temptatius. L'ordre dels valors de les constants de SeCyst pels diferents ions metàl·lics és Hg^{2+}>Cd^{2+}~Zn^{2+}>Ni^{2+}>Co^{2}

10. El comportament de SeCyst en sistemes competitius ha estat estudiat a través de dos casos model: *i)* complexació competitiva de Zn^{2+} i Cd^{2+} per SeCyst; i *ii)* complexació competitiva de SeCyst i glutatió (GSH) per Cd^{2+}. La comparació de les propietats de les interaccions del diseleniur amb tiols biològicament importants com el glutatió (GSH) és particularment interesant. En el primer cas, la presència de dos components CD-actius, conjuntament amb els resultats de DPP, permeten proposar la formació del complex mixt ZnCd(SeCyst). En el segon cas, no es varen observar interaccions entre GSH i SeCyst, com ara la separació dels respectius pics electroquímics. Quan s'afegeix SeCyst a Cd^{2+}:GSH, SeCyst desplaça GSH dels seus complexos amb Cd^{2+} (especialment $Cd(GSH)_2$) i dóna lloc a complexos més estables. A més, les dades electroquímiques suggereixen que no es formen complexos mixtos (de lligand). L'ús combinat de diverses tècniques basades en principis totalment diferents permet aconseguir una descripció detallada del sistema estudiat
11. S'han comparat dos models diferents per la heterogeneïtat de la superfície electròdica amb la teoria de Marcus–Hush per a una superficie homogènia i amb els resultats experimentals. El model MHC s'ha emprat per parametritzar les reaccions redox d'una espècie unida a la superfície, i els resultats han estat raonablement bons. Les superfícies heterogènies, no obstant, mostren un interval de velocitats de reacció i donen representacions ln|i| vs t no lineals. Això implica que l'obtenció de dades cinètiques és molt més difícil. No obstant això, ha estat possible la seva obtenció.

Conclusions

The main conclusions derived from the several studies performed throughout this Ph.D. thesis are as follow:

1. From the combination of DPP and MCR-ALS, valuable information of the competition between different short chain single thiol peptides for heavy metal binding can be reached. In the model considered for Cys/Cys-Gly/Cd: i) no evidence of mixed ligand complexes has been found, and ii) a fast exchange equilibrium of the metal among the different ligands was observed, since the short time between consecutive additions proved to be sufficient to displace the metal in order to form the complexes that *a priori* appeared to be more stable.
2. For the systems involving a phytochelatin and a fragment containing a thiol goup (Cys-Gly/PC_2; Cys/PC_3) in the presence of Cd^{2+}, the results evidence that longer chain peptides containing more thiol groups easily displace shorter peptides from their metal complexes, and also that such displacement is very fast, since equilibrium is reached inside the few minutes taken by every addition followed by solution stirring.
3. The complementary ESI-MS information confirms the presence in both systems of the majority species detected voltammetrically. In the case of the Cd^{2+}-PC_2-Cys-Gly mixture, ESI-MS detects also a few mixed ligand species. This could mean that: i) such species exist in solution in very low concentrations that are not detectable by voltammetry; ii) they are detected by voltammetry, but their signals are so close to these of majority species that they cannot be distinguished from them; and iii) they do not exist in solution, but are created during the ionisation process of ESI-MS. As hypothesis i) appears to be the most probable one, the question is why mixed ligand complexes are not stabilised as an intermediate stage between the substitution of several short chain ligands by the first and the second longer chain ligand?. This could be related to esteric effects or to the tendency of some thiol peptides to join two long chain molecules with the binding of several metal-ions. Further experiments with complementary techniques would be required to solve this question.
4. In the competitive binding of phytochelatins towards Cd^{2+}, for PC with n≤3, longer chain peptides (those with higher n values) easily displace Cd^{2+} ions from their complexes with short chain molecules, and the new complexes appear to be more stable, as suggested by the more negative peak potentials of their reduction signals. As expected, the inverse process (i.e., the displacement of metal ions from long to short chain peptides) is not observed.
5. At n≥3 the shape and position of the corresponding PC_n metal complexes become very similar and this suggests that in longer peptide metal binding is more determined

by the nature of complexing sites separately than by the whole molecule. This could be also related to the fact that at n≥4 the number of thiol groups in the peptide can "saturate" the coordination number of Cd^{2+} (typically tetrahedral). Anyway, the coincidence mentioned in the signal positions hindered a more rigorous study on the metal exchange between peptides with n≥3.

6. In all cases, the increase of n produces an increase of the number of metal ions that can be bound to a PC_n molecule. This could mean that when a large excess of metal ions is added, they are bound by a minimal of thiol groups, so that the quantity of metals that can be bound depends on the quantity of thiol groups.
7. The proposed methodology, *i.e.*, a combination of chemometrical analysis (MCR-ALS, GPA, *pHfit*) to voltammetric and spectroscopic measurements complemented by ESI-MS results, has shown a great ability to extract valuable information from the $Cd^{2+}/Pb^{2+}/PC_5$ system, especially because of the contrast of very different experimental techniques which provide complementary points of view. The excellent results suggest that similar strategies could be successfully applied to many involved bioinorganic systems whose low concentration levels prevents the use of conventional techniques for structure determination.
8. The use of ITC, CD spectroscopy and voltammetry (through DPP mode) assisted by some very recently developed chemometric methods, as GPA, has allowed us to investigate the metal-binding properties of SeCyst inside a wide pH range. No electrochemical evidences were found for the formation of metal complexes with Bi^{3+}, Cu^{2+}, $Cr^{3+}$and Pb^{2+}. In contrast, SeCyst formed electroinactive complexes with Co^{2+} and Ni^{2+}, and kinetically inert but electroactive complexes with Cd^{2+} and Zn^{2+}. For Zn-SeCyst, an irreversible reduction process was characterized.
9. Calorimetric titrations of SeCyst with Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, and Zn^{2+} produced curves reasonably well fitted by the one set of sites model for the formation of stable 1:1 M(SeCyst) complexes. The exception seems to be the case of mercury, because other processes are present that affect the ITC curve and, as a consequence, the fitted parameters are merely tentative. The order of the SeCyst binding constant for metal ions is $Hg^{2+}>Cd^{2+}\sim Zn^{2+}>Ni^{2+}>Co^{2}$
10. The behavior of SeCyst in competitive systems has been studied through two model cases: *i)* competitive binding of Zn^{2+} and Cd^{2+} towards SeCyst, and *ii)* competitive binding of SeCyst and glutathione (GSH) towards Cd^{2+}. The comparison of the properties of diselenide bond with a biologically important thiol as GSH is particularly interesting. In the first case, the presence of two CD-active components, supported by DPP results, allows us to propose the formation of the mixed ZnCd(SeCyst) complex. In the second case, no interactions between GSH and SeCyst were

observed, as separation of the respective electrochemical peaks showed. When SeCyst was added to Cd^{2+}: GSH, SeCyst displaced GSH from its Cd^{2+} complexes (mainly $Cd(GSH)_2$) yielding more stable ones. Moreover, electrochemical data suggested that no mixed ligand complexes are formed. The combined use of several techniques based in totally different principles allowed us to reach a detailed picture of systems studied.

11. Two different models for electrode surface inhomogeneity have been compared with both Marcus–Hush theory for a homogeneous surface and with experimental results. The MHC model has been used in parameterising the redox reactions of a surface-bound species and, in this regard, it has been reasonably successful. Inhomogeneous surfaces, however, show a range of reaction rates and have been shown to yield non-linear ln|i| vs t plots. This renders the extraction of kinetic data much more difficult, though this has been achieved.

Conclusões

As principais conclusões dos diferentes estudos ao longo desta tese são:

1. A combinação de DPP e MCR-ALS produziu informação valiosa sobre a complexação competitiva entre os diferentes péptidos de cadeia curta com um único grupo tiol na presença de metais pesados. No modelo proposto para o sistema Cys / Cys-Gly / Cd: i) não se verificou a formação de complexos mistos envolvendo os diferentes ligandos, e ii) verifica-se equilíbrio de troca rápida do ião metalico entre os ligandos, uma vez que o curto tempo entre as adições consecutivas é suficiente para deslocar o metal e formar o complexo mais estável.

2. Para sistemas constituídos por uma fitoquelatina e um dos seus fragmento contendo um grupo tiol (Cys-Gly/PC_2; Cys/PC_3) na presença de Cd^{2+}, os resultados demonstram que os péptidos de cadeia mais longa, contendo maior número de grupos tiol, deslocalizam mais facilmente o Cd^{2+} dos seus complexos de metal com os peptídeos de cadeia mais curta. Esta mudança é também ela muito rápida, porque o equilíbrio é atingido em poucos minutos entre cada adição.

3. As informações suplementares obtidas por ESI-MS confirmaram para os sistemas ambos a presença das espécies maioritarias detectadas voltamétricamente. No caso do sistema Cd^{2+}/PC_2/Cys-Gly, por ESI-MS detectou-se também a existência de alguns complexos mistos. Isto pode significar que tais espécies: i) existem em solução mas em concentrações muito baixas, logo não detectáveis por voltametria; ii) são detectadas por voltametria, mas os seus sinais encontram-se sobrepostos com os das espécies maioritárias tornando-os indistinctos; ou iii) não existem em solução, mas são criadas durante o processo de ionização ESI-MS. A primeira hipótese parece ser mais plausivel, uma vez que a questão é se os complexos mistos exitem em solução apenas como um passo intermediário na substituição de ligandos de cadeia curta para a cadeia mais longa. Isto pode estar relacionado com impedimentos estéricos ou a tendência de deste tipo de ligandos para juntar duas moléculas de cadeia longa para complexar vários iões metálicos. Seria necessário recorrer a experiências com outras técnicas complementares para resolver este problema.

4. Na complexação competitiva entre fitoquelatinas com Cd^{2+}, quando $n \leq 3$, os péptidos de cadeia longa (com valores de n maior) facilmente deslocam os iões Cd^{2+} do seu complexo com as moléculas de cadeia curta e os novos complexos parecem ser mais estáveis, como sugerido pelos potenciais de redução de mais negativos.

Como esperado, o processo inverso (i.e., o deslocamento dos iões metálicos a partir dos ligandos de cadeia longa para os de cadeia curta), não é observada.

5. Quando n ≥ 3 a forma e a posição dos sinais de redução dos complexos metal com as diferentes PC_n torna-se muito semelhantes. Por conseguinte, a ligação do ião metálico com as PC_n de cadeia mais longa é determinada pela natureza dos grupos funcionais do que a molécula no seu todo. Isto poderia também relacionar-se com o facto de que, para n ≥ 4 o número de grupos tiol do péptido pode "saturar" o número de coordenação de Cd^{2+} (tipicamente tetraédrico). De qualquer forma, a elevada sobreposição dos sinais impede que seja seguida a permuta de iões metálicos entre péptidos com n ≥ 3.

6. Em todos os casos, o aumento “n” resulta num aumento no número de iões de metal que se podem ligar a uma fitoquelatina. Isto significa que, aquando da adição de um grande excesso destes iões metálicos, estes estarão ligados por um número mínimo de grupos tiol, como tal a quantidade de iões que podem estar complexados com uma fitoquelatina dependerá da quantidade de grupos tiol.

7. A combinação de análise quimiométrica (MCR-ALS, GPA, *pHfit*) a datos voltamétricos e espectroscópicos complementados com resultados de ESI-MS, mostrou um grande potencial para extrair informações valiosas do sistema $Cd^{2+}/Pb^{2+}/PC_5$, graças contraste das técnicas e estas serem muito diferentes fornecendo visões complementares. Os excelentes resultados obtidos sugerem que estratégias semelhantes podem ser aplicados com sucesso a sistemas complexos inorgânicos, cujos níveis de concentração baixa impedem a utilização de técnicas convencionais de análise estrutural.

8. O uso de ITC, espectroscopia de CD e a voltametria (modo DPP), apoiado por alguns métodos quimiométricos recentemente desenvolvidos, tais como GPA, permitiu investigar as propriedades complexantes da SeCyst em presença de diversos iões metálicos numa ampla gama de pH. Nenhuma evidência electroquímica foi encontrada para a formação complexos metálicos com Bi^{3+}, Cu^{2+}, Cr^{3+} e Pb^{2+}. Em contraste, formaram-se complexos electroinactivos SeCyst com Co^{2+} e Ni^{2+}, e complexos cineticamente inertes mas electroactivo para Cd^{2+} e Zn^{2+}.

9. As titulações calorimétricas de SeCyst com Cd^{2+}, Co^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+}, Zn^{2+} produziram curvas que se encaixam no razoavelmente modelo *one binding site* (um conjunto de sítios), indicando a formação de complexos estáveis 1:1 M(SeCyst). A exceção parece ser o caso do Hg, onde outros processos afectam a curva ITC. A ordem da

constante de complexação de SeCyst com os iões de metálicos estudados foi: Hg^{2+}> Cd^{2+} ~ Zn^{2+}> Ni^{2+}> Co^{2+}.

10. O comportamento da SeCyst em sistemas competitivos foi também estudada usando dois casos de modelo anteriormente usados nesta Tese: i) complexação competitiva de Zn^{2+} e Cd^{2+} com SeCyst, e ii) a complexação competitiva de SeCyst e glutatião (GSH) com Cd^{2+}. A comparação das propriedades de ligação com um tiol biologicamente importante como GSH com um disseleneto é particularmente interessante. No primeiro caso, a presença de dois componentes activos em CD, apoiada pelos resultados de DPP permite propor a formação do complexo metálico misto ZnCd(SeCyst). No segundo caso, não se observou qualquer interacção entre GSH e SeCyst como mostrado pela separação electroquímica dos picos respectivos. Quando a SeCyst é adicionada ao Cd^{2+}: GSH, SeCyst desloca a GSH dos complexos com Cd^{2+} (maioriatariamente $Cd(GSH)_2$) para a produção de outros mais estável. Além disso, os dados electroquímicos sugerem que não se formam complexos mistos com os diferentes ligandos. Em resumo, a utilização combinada de várias técnicas com base em princípios inteiramente diferentes levou a uma descrição pormenorizada dos sistemas estudados.

11. Foram comparados dois modelos diferentes de falta de homogeneidade da superfície do eletrodo com a teoria de Marcus-Hush-Chidsey (MHC) para uma superfície homogênea e com resultados experimentais. O modelo de MHC foi usado para parametrizar as reacções redox de espécies ligadas à superfície e, a este respeito foi razoavelmente satisfatória. As superfícies não homogéneos apresentam uma determinada gama de velocidades de reacção, tal como foi mostrado para produzir representações ln (i) *vs* t não-linear. Embora isso torne mais difícil para extrair dados cinéticos, esses dados foram obtidos.