



Desarrollo de metodologías y herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos electroquímicos no lineales. Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental

Santiago Cavanillas López

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

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

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



Programa de doctorado

Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

**Desarrollo de metodologías y herramientas quimiométricas
para el tratamiento de datos electroquímicos no lineales.
Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental**

Memoria presentada por

Santiago Cavanillas López

para optar al grado de

Doctor por la Universitat de Barcelona

Dirección

Dra. Cristina Ariño Blasco

Universitat de Barcelona
Departament de Química Analítica

Dr. José Manuel Díaz Cruz

Universitat de Barcelona
Departament de Química Analítica

Programa de doctorado

Química Analítica del Medi Ambient i la Pol·lució

Memoria presentada por Santiago Cavanillas López
para optar al grado de Doctor por la Universitat de Barcelona.

**Desarrollo de metodologías y herramientas quimiométricas para
el tratamiento de datos electroquímicos no lineales. Aplicación
a sistemas de interés biológico y medioambiental**

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

Hacen constar que la presente tesis doctoral, titulada “*Desarrollo de metodologías y herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos electroquímicos no lineales. Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental*”, ha sido realizada por el Sr. Santiago Cavanillas López bajo nuestra dirección en el Departament de Química Analítica de la Universitat de Barcelona.

Barcelona, Septiembre de 2014

Dra. Cristina Ariño Blasco

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

Dr. José Manuel Díaz Cruz

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

A mi familia por todo su amor, apoyo y confianza.

*“Sometimes scientific progress is not based on
a discovery or the generation of new data,
but on a change of viewpoint that allows one to
see a set of already existing data in a new light”*

Michael Reth

Índice

<i>Objetivos</i>	<i>xiii</i>
<i>Estructura y contenidos de la memoria</i>	<i>xv</i>
<i>Abstract</i>	<i>xix</i>
<i>Abreviaturas, acrónimos y siglas</i>	<i>xxi</i>
<i>Parte I. Introducción</i>	<i>1</i>
Capítulo 1. Métodos quimiométricos	3
1.1. Quimiometría en electroanálisis	5
1.1.1. Diseño experimental y pretratamiento de datos electroquímicos	6
1.1.2. Exploración de datos y clasificación de muestras	7
1.1.3. Calibración multivariante	8
1.1.4. Identificación de modelos químicos	10
1.2. Resolución multivariante de curvas mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)	12
1.2.1. <i>Hard y Soft modelling</i>	15
1.3. Limitaciones de MCR en el tratamiento de datos electroquímicos	17
1.3.1. Ambigüedades en el tratamiento de datos electroanalíticos	17
1.3.2. Metodologías MCR para el tratamiento de datos no lineales	18

Capítulo 2. Sistemas estudiados	23
2.1. Metales pesados	25
2.1.1. Arsénico	26
2.1.2. Cadmio	27
2.1.3. Cobre	28
2.1.4. Plomo	29
2.2. Interacción de los metales con otras especies químicas	31
2.2.1. Formación, estabilidad y selectividad de complejos	31
2.2.2. Técnicas utilizadas en los estudios de complejación	33
2.3. Sistemas complejantes metal-ligando estudiados	34
2.3.1. Fitoquelatinas y metales pesados	34
2.3.2. Agentes quelantes y arsénico	38
2.3.3. Bencilaminopurina y cobre	42
2.3.4. Otros sistemas complejantes	43
Capítulo 3. Electrodo de Hg. Aplicación y dificultades en la interpretación de las señales	45
3.1. Electrodo de mercurio	47
3.2. Medidas en presencia de tioles	48
3.3. Aplicación a estudios de complejación	49
3.4. Dificultades en la interpretación de las señales	52
3.4.1. Solapamiento de señales	52
3.4.2. Complejo lábil e inerte	53
3.4.3. Pérdida de linealidad	53

<i>Parte II. Metodologías aplicadas</i>	55
Capítulo 4. Técnicas instrumentales	57
4.1. Técnicas voltamperométricas	59
4.1.1. Polarografía diferencial de impulsos	61
4.1.2. Voltamperometría cíclica	62
4.1.3. Voltamperometría de impulsos de gran amplitud	63
4.2. Espectrometría de masas	65
4.3. Valoración calorimétrica isotérmica	68
4.4. Absorción molecular ultravioleta visible	70
Capítulo 5. Tratamiento de datos	73
5.1. Resolución multivariante de curvas por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)	75
5.2. Voltamperometría de eliminación con barrido lineal (EVLS)	77
<i>Parte III. Sección experimental</i>	81
Capítulo 6. Instrumentación y reactivos	83
6.1. Instrumentación	85
6.1.1. Instrumentación electroquímica	85
6.1.2. Instrumentación de espectrometría de masas	88
6.1.3. Instrumentación calorimétrica	89
6.1.4. Instrumentación espectrofotométrica de UV-vis	90

6.2. Reactivos y disoluciones	90
6.2.1. Reactivos	90
6.2.2. Preparación de las disoluciones	92
Capítulo 7. Procedimientos experimentales	95
7.1. Estudios por técnicas voltamperométricas	97
7.2. Medidas por espectrometría de masas (ESI-MS)	99
7.3. Valoraciones por ITC	100
7.4. Estudio por espectrofotometría UV-vis	100
<i>Parte IV. Resultados y discusiones</i>	<i>103</i>
Capítulo 8. Desarrollo de la metodología quimiométrica PSF-GPA	105
8.1. Introducción	107
8.2. <i>Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: a new multivariate curve resolution method for non-bilinear voltammetric measurements.</i>	111
8.3. <i>Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: implementation of 2D transversal constraints and its application for the determination of pK_a and complexation constants by differential pulse voltammetry.</i>	127
8.4. Discusión de resultados	139
Capítulo 9. Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental	157
9.1. Introducción	159
9.2. <i>Voltammetric analysis of phytochelatin complexation in ternary metal mixtures supported by multivariate analysis and ESI-MS.</i>	163

9.3. <i>Electroanalytical and isothermal calorimetric study of As(III) complexation by the metal poisoning remediators, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid.</i>	179
9.4. <i>Application of different chemometric strategies to voltammetric and UV-vis spectroscopic data to obtain a complexation model: study of the Cu(II) binding with the phytohormone 6-benzylaminopurine.</i>	187
9.5. Discusión de resultados	197
Capítulo 10. Desarrollo de un sensor voltamperométrico con sistema de autopulido	209
10.1. Introducción	211
10.2. <i>A Self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex and crude media.</i>	213
10.3. Discusión de resultados	229
<i>Parte V. Conclusiones</i>	233
<i>Parte VI. Bibliografía</i>	239
<i>Agradecimientos</i>	255

Objetivos

Los objetivos principales que se han propuesto en esta Tesis quedan definidos en su título: "*Desarrollo de metodologías y herramientas quimiométricas para el tratamiento de datos electroquímicos no lineales. Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental*".

Las dificultades en el análisis de los datos electroquímicos obtenidos en estudios de complejación hace necesaria la utilización de herramientas quimiométricas de *soft modelling*, debido a que la naturaleza de las técnicas, la cinética de las reacciones electroquímicas y la ventana de tiempo de la medición pueden afectar dramáticamente a la linealidad de los datos evidenciando movimientos en el potencial de pico y cambios en la forma y/o simetría de las señales unitarias. En estas condiciones, las metodologías y programas quimiométricos existentes no son aplicables.

Por ello, el objetivo inicial se centró en el desarrollo y programación de herramientas quimiométricas, en entorno Matlab, para el análisis de datos voltamperométricos no lineales. La nueva metodología está enfocada al análisis de estos datos mediante la modelización de las señales voltamperométricas.

Una vez validada la metodología con sistemas bien conocidos, se abordó el siguiente objetivo que fue la comprobación de su capacidad de análisis y su versatilidad para el tratamiento de datos voltamperométricos (lineales y no lineales) de diferentes sistemas metal/ligando tanto de interés biológico como medioambiental. Los resultados

obtenidos fueron corroborados y complementados mediante diversas técnicas instrumentales.

Estructura y contenidos de la memoria

Teniendo en cuenta que el propósito principal de esta Tesis Doctoral es el desarrollo y aplicación de una nueva metodología quimiométrica para el tratamiento de datos voltamperométricos no lineales, la introducción de la Tesis (**I. Introducción**) se ha dividido en tres capítulos. En el **Capítulo 1**, se explican las principales características de las diversas metodologías quimiométricas utilizadas en el campo de la química electroanalítica. En el **Capítulo 2** se justifican y describen los diferentes sistemas metal/ligando estudiados, todos ellos con un interés biológico o medioambiental. Finalmente, en el **Capítulo 3** se detallan los procesos electroquímicos y las interacciones que tienen lugar en el electrodo de mercurio durante la medida polarográfica.

En la segunda parte de la memoria (**II. Metodologías aplicadas**) se explican de manera exhaustiva las técnicas instrumentales y los tratamientos de datos que se han utilizado pero no se han desarrollado específicamente para la presente Tesis. En la siguiente parte (**III. Sección experimental**), se repasan la instrumentación, los reactivos, las disoluciones y los procedimientos empleados en cada tipo de estudio para cada técnica instrumental considerada.

Finalmente, la memoria muestra una última parte (**IV. Resultados y discusión**) donde se exponen y discuten los trabajos publicados. Para una mejor exposición de los resultados esta parte se ha organizado en tres capítulos:

En el primero (**Capítulo 8**) se recogen los dos artículos que describen el fundamento de la nueva metodología quimiométrica Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment (PSF-GPA) desarrollada para el tratamiento de datos no lineales. El trabajo inicial explica el PSF-GPA, el cual se basa en el ajuste de dos funciones gaussianas, una a cada lado de la señal analítica en forma de pico, y su aplicación a dos sistemas no lineales. Los resultados se comparan con los obtenidos con la metodología quimiométrica que normalmente se utiliza para la resolución de estos sistemas y que requiere de datos totalmente o parcialmente lineales. En el segundo artículo se presenta la mejora significativa del PSF-GPA que supone aplicar unas restricciones transversales que aumentan la consistencia y resolución de las señales de un conjunto de datos voltamperométricos para un determinado sistema metal/ligando. Los resultados obtenidos se validaron con datos bibliográficos.

En el siguiente capítulo (**Capítulo 9**), la metodología PSF-GPA desarrollada se aplica a tres sistemas complejantes diferentes, los cuales tienen un interés biológico o medioambiental relevante. Estos estudios corresponden a tres trabajos en los que se aplicó la nueva metodología quimiométrica a datos voltamperométricos, y los resultados fueron complementados y confirmados mediante estudios realizados con otras técnicas analíticas instrumentales.

En último lugar, en el **Capítulo 10**, se exponen los resultados obtenidos durante mi estancia de 4 meses en el grupo *Biosensor and Bioelectronics* de la Universidad de Linköping (Suecia) bajo la tutela de los Profesores A. Turner y F. Winquist, y que se realizó con objeto de complementar mis investigaciones y, al mismo tiempo, optar a la Mención Internacional de Doctorado. El trabajo desarrollado durante este periodo consistió en la aplicación de un nuevo sensor voltamperométrico que incorpora un sistema automatizado de pulido. El objetivo de la incorporación de este sistema de autolimpieza y el diseño del sensor es el de medir de manera continua diferentes muestras, las cuales presentan un comportamiento complejo y donde el deterioro de los electrodos suele provocar una deriva de la señal analítica. El trabajo ha dado lugar a un artículo que se ha enviado para su publicación.

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

Los trabajos presentados en la memoria de la Tesis son:

➤ **Capítulo 8**

1- Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: A new multivariate curve resolution method for non-bilinear voltammetric measurements.

Autores: S. Cavanillas, J.M Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.

Analytica Chimica Acta, 689 (2011) 198–205.

2- Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: implementation of 2D transversal constraints and its application for the determination of pK_a and complexation constants by differential pulse voltammetry.

Autores: S. Cavanillas, N. Serrano, J.M Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.

Analyst, 138 (2013) 2171–2180.

➤ **Capítulo 9**

3- Voltammetric analysis of phytochelatin complexation in ternary metal mixtures supported by multivariate analysis and ESI-MS.

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

Electroanalysis, 24 (2012) 309–315.

4- Electroanalytical and isothermal calorimetric study of As(III) complexation by the metal poisoning remediators, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid.

Autores: S. Cavanillas, E. Chekmeneva, C. Ariño, J.M Díaz-Cruz, M. Esteban.

Analytica Chimica Acta, 746 (2012) 47–52.

5- Application of different chemometric strategies to voltammetric and UV-vis spectroscopic data to obtain a complexation model: study of the Cu(II) binding with the phytohormone 6-benzylaminopurine.

Autores: *S. Cavanillas, A. Alberich, N. Serrano, J.M Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban.*

Analyst, 137 (2012) 5420–5427.

➤ **Capítulo 10**

6- A self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex and crude media.

Autores: *S. Cavanillas, F. Winqvist, M. Eriksson.*

Enviado para su publicación.

Abstract

The main objective of this Thesis is the development of a new chemometric strategy for the treatment of non-linear voltammetric data, especially these obtained in complexation studies. Several chemometric methodologies of soft modelling, as multivariate curve resolution by alternating least squares (MCR-ALS), are widely used for the analysis of voltammetric measurements but their application requires linear data. This premise cannot always be fulfilled when metal-ligand complexation systems are studied. Many times, peak-shaped voltammetric signals progressively get broader or narrower (due to changes in electrochemical reversibility) and move along the potential axis (e.g., due to fast equilibria), causing a dramatic loss of linearity.

In order to achieve the overall objectives, the Thesis is divided in two parts:

In the first part, a new chemometric strategy based on the fitting of signals to parametric functions (PSF) is proposed for the multivariate curve resolution (MCR) analysis of non-linear voltammetric data. The method is based on the least squares fitting of gaussian functions (Gaussian Peak Adjustment, GPA) at both sides of the peaks by using adjustable parameters for the peak height, position and symmetry. Then, transversal constraints are implemented to increase the consistency of the resolution along the different signals of a voltammetric dataset. The constraints deal with the evolution of peak potentials versus pH and with the implementation of chemical equilibrium constants.

The second part consists on the application of the GPA method to complexation systems of biological and environmental interest. The aim is testing the capacity and versatility of the proposed data treatment for linear and non-linear voltammetric data. The obtained results have been corroborated and complemented with measurements by different analytical techniques. The obtained information is very useful for the interpretation of the electrochemical behavior of these systems as well as for determining both the stoichiometries and the stabilities of the complexes.

The last chapter of the Thesis presents the work carried out at the Linköping University (Linköping, Sweden) during a period of 4 months under the supervision of Professor Anthony Turner and Professor Fredrik Winqvist. The work done consists on the development of a new self-polishing voltammetric sensor to eliminate sensor drift produced by electrode fouling. The sensor was applied to three different complex systems.

As a result of the research carried out in this Thesis, five articles have been published in peer-reviewed journals of significant impact factor and another manuscript has been submitted. These publications are the basis of the work exposed here.

The Thesis is presented as the continuation of the research work of the Electroanalysis group dedicated to the development, adaptation and application of soft modelling chemometric methodologies to voltammetric data. The presented methodology, which is based on parametric signal fitting by gaussian peak adjustment (PSF-GPA), appears to be a promising strategy for the multivariate curve resolution of non-linear data. This methodology has been successfully applied to complexation systems with biological and environmental interest. Also, the consistency of the PSF-GPA has been improved with the implementation of transversal constraints.

Abreviaturas, acrónimos y siglas

Alternating current voltammetry	ACV	Voltamperometría de corriente alterna
Alternating least squares	ALS	Mínimos cuadrados alternados
Artificial neuronal network	ANN	Redes neuronales artificiales
Atmospheric pressure chemical ionization	APCI	Ionización química a presión atmosférica
Anodic stripping voltammetry	ASV	Voltamperometría de redisolución anódica
Chemical ionization	CI	Ionización química
Classical least squares	CLS	Mínimos cuadrados clásicos
Cathodic stripping voltammetry	CSV	Voltamperometría de redisolución catódica
Cyclic voltammetry	CV	Voltamperometría cíclica
Dropping mercury electrode	DME	Electrodo de gotas de mercurio
Differential pulse polarography	DPP	Polarografía diferencial de impulsos
Differential pulse voltammetry	DPV	Voltamperometría diferencial de impulsos
Electron ionization	EI	Electroionización

Electrospray ionization	ESI	Ionización por electrospray
Electronic tongue	ET	Lengua electrónica
Elimination voltammetry with linear scan	EVLS	Voltamperometría de eliminación con barrido lineal
Fast atom bombardment	FAB	Bombardeo con átomos rápidos
Field desorption	FD	Desorción de campo
Food and drug administration	FDA	Administración de medicamentos y alimentos
Fast fourier transform	FFT	Transformada rápida de Fourier
Field ionization	FI	Ionización de campo
Hanging mercury drop electrode	HMDE	Electrodo de gota colgante de mercurio
High performance liquid chromatography	HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
International agency for research on cancer	IARC	Agencia internacional para la investigación sobre el cáncer
Ion cyclotron resonance	ICR	Resonancia iónica en ciclotrón
International chemometrics society	ICS	Sociedad internacional de quimiometría
Inverse least squares	ILS	Mínimos cuadrados inversos
Ion trap	IT	Trampa de iones
Isothermal titration calorimetry	ITC	Valoración calorimétrica isotérmica
Stability constant	K_a	Constantes de estabilidad
Kalman filter	KF	Filtro de Kalman
Large amplitude pulse voltammetry	LAPV	Voltamperometría de impulsos de gran amplitud
Laser desorption ionization	LDI	Ionización por desorción láser
Light emitting diode	LED	Diodo emisor de luz
Lack of fit	<i>lof</i>	Falta de ajuste

Linear sweep voltammetry	LSV	Voltamperometría de barrido lineal
Matrix assisted laser desorption ionization	MALDI	Ionización por desorción láser asistida por una matriz
Multivariate curve resolution	MCR	Resolución multivariante de curvas
Multivariate curve resolution by alternating least squares	MCR-ALS	Resolución multivariante de curvas por mínimo cuadrados alternados
Multiple linear regression	MLR	Calibración lineal multivariante
Mass spectrometry	MS	Espectrometría de masas
Normal pulse voltammetry	NPV	Voltamperometría de impulsos normal
Principal component	PC	Componente principal
Principal component analysis	PCA	Análisis por componentes principales
Principal component regression	PCR	Regresión por componentes principales
Partial least squares	PLS	Mínimos cuadrados parciales
Quadrupole	Q	Cuadrupolo
Simple to use interactive self-modelling analysis	SIMPLISMA	Análisis de auto modelado interactivo sencillo de usar
Static mercury drop electrode	SMDE	Electrodo de gotas de mercurio estacionario
Singular value decomposition	SVD	Descomposición en valores singulares
Square wave voltammetry	SWV	Voltamperometría de onda cuadrada
Time of flight	TOF	Tiempo de vuelo
Thermospray ionization	TSP	Ionización por termospray
Ultraviolet spectroscopy	UV	Espectroscopia ultravioleta

Ultraviolet visible spectroscopy	UV-vis	Espectroscopia ultravioleta visible
Voltammetric electronic tongue	VET	Lengua electrónica voltamperométrica
World health organization	WHO	Organización mundial de la salud
Gibbs free energy	ΔG	Energía libre de Gibbs
Enthalpy	ΔH	Entalpía
Entropy	ΔS	Entropía

Compuestos

ADP	Adenosín difosfato
ATP	Adenosín trifosfato
BAP	6-Benciaminopurina
Cys	Cisteína
DMSA	Ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico
DMPS	2,3-Dimercapto-1-propanosulfónico
GCS	γ -Glutamylcisteín sintasa
Glu	Ácido glutámico
Gly	Glicina
GS	Enzima glutatión sintasa
GSH	Glutatión
HMT1	Proteína vacuolar codificada por el gen Heavy Metal Tolerance.
MTs	Metalotioneínas
PC_n	Fitoquelatina (n = 2-5)
PCs	Fitoquelatinas
PCS	Enzima fitoquelatina sintasa
YCF1	Proteína vacuolar codificada por el gen Yeast Cadmium Factor

Parte I.

Introducción

Capítulo 1

Métodos quimiométricos

En este capítulo se presenta una visión general del uso de diferentes metodologías quimiométricas en el tratamiento de datos electroquímicos, especialmente de sistemas complejantes metal-ligando, haciendo un mayor hincapié en el método de resolución multivariante de curvas mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS). Se explica de manera pormenorizada el funcionamiento iterativo de MCR-ALS y las restricciones aplicables a los datos voltamperométricos para la obtención de un resultado lógico desde el punto de vista químico. Igualmente se considera la aplicación de los diferentes tipos de modelado. A pesar de la potencia y versatilidad de la aplicación de MCR-ALS a datos electroquímicos, la naturaleza de estos a veces dificulta su interpretación, por ello se explican ciertas ambigüedades que aparecen en el tratamiento mediante MCR. Por otro lado, la pérdida de linealidad de los datos imposibilita muchas veces su aplicación. Por esta razón, se han desarrollado herramientas, como *shiftfit* y *pHfit*, para solventar la pérdida de la linealidad de los datos causada por el desplazamiento de las señales.

1.1. Quimiometría en electroanálisis

La ICS (International Chemometrics Society) definió en 1975 la quimiometría como “la disciplina química que utiliza métodos matemáticos y estadísticos para diseñar o seleccionar procedimientos de medida y experimentos óptimos, y para proporcionar la máxima información química mediante el análisis de datos químicos”.

Durante las pasadas dos décadas se han publicado una gran cantidad de artículos y revisiones sobre la aplicación de la quimiometría al tratamiento de datos electroquímicos, destacando su aplicación a datos obtenidos con sensores electroquímicos, microsensores (*sensor array*) y lenguas y narices electrónicas [1-8]. Los avances en el tratamiento de datos se centraron en el desarrollo y aplicación de metodologías quimiométricas con el objetivo de solventar problemas electroquímicos. Estos progresos incrementaron el potencial de la quimiometría en la resolución y el análisis de estos datos electroanalíticos. Aun así, el uso de la quimiometría es inferior en este campo en comparación al de la espectroscopía o el análisis de imágenes. El uso de la instrumentación electroquímica moderna, la cual proporciona datos muy fiables y reproducibles, ha originado un aumento del interés y un auge en la aplicación de métodos quimiométricos al tratamiento de datos electroquímicos y, en particular voltamperométricos. Este hecho viene estimulado por el enorme avance de las capacidades, utilidades y aplicaciones del binomio quimiometría – técnicas electroanalíticas.

Las diferentes metodologías quimiométricas se pueden aplicar a los datos con diferentes finalidades tales como:

- i) Diseño experimental, optimización de los parámetros experimentales e instrumentales, preparación y transformación de los datos para posteriores tratamientos de los mismos.
- ii) Exploración de datos y clasificación de muestras.
- iii) Determinación de concentraciones y calibrados.
- iv) Identificación de modelos.

1.1.1. Diseño experimental y pretratamiento de datos electroquímicos

La quimiometría se ha aplicado al diseño experimental con el fin de encontrar la forma más eficiente de obtener un producto, un proceso o una información mediante el análisis del conjunto de las condiciones requeridas y necesarias para su obtención. Para ello, las variables que les afectan se cambian de manera controlada para el estudio de sus efectos durante el procedimiento y así poder determinar el efecto de la relación entre los factores y las respuestas realizando el mínimo número de experimentos. Asimismo, la aplicación de la quimiometría ha ayudado, mediante la optimización de las condiciones experimentales y los parámetros instrumentales, a alcanzar unos resultados más satisfactorios durante las determinaciones electroquímicas, especialmente las llevadas a cabo por voltamperometría [9,10].

La aparición de ruido en las medidas electroquímicas es algo normal. Las fuentes del ruido son los artefactos instrumentales y las corrientes parásitas. En las medidas electroquímicas normalmente se estudian las corrientes de naturaleza farádica, y consecuentemente, se pueden considerar dentro del ruido las corrientes capacitivas. Con la intención de reducir al mínimo la contribución capacitiva, se desarrollaron diferentes técnicas electroanalíticas (según se explica más extensamente en el apartado 4.1 de técnicas voltamperométricas). Para evitar este ruido, los datos experimentales normalmente necesitan un tratamiento previo a la aplicación de cualquier metodología quimiométrica. Por ello se han desarrollado métodos que proporcionan mejoras importantes en la detección de valores atípicos (*outliers*) y eliminación de ruido, ya sea sustrayendo la línea de base, suavizando, transformando o comprimiendo los datos.

Existe una gran cantidad de bibliografía que hace referencia a diferentes tratamientos de procesamiento de señales electroquímicas con el fin de suavizar o eliminar el ruido de los datos y de esta manera facilitar la estimación de parámetros, como el potencial de pico o la intensidad. También se han desarrollado metodologías de tratamientos de datos como la deconvolución o resolución de señales. Para estos tipos de procesamiento los métodos más utilizados son el de Savitzky-Golay [11], el filtro de Kalman (KF) [12] y la transformada rápida de Fourier (FFT) [13]. Con la intención de hacer una corrección de la línea base se pueden utilizar programas comerciales o *homemade* como, por ejemplo el *baseline* (desarrollado en entorno Matlab por el grupo Electroanálisis de la UB), el cual se basa en la creación de una nueva línea base a partir del ajuste de un

polinomio a los puntos marcados manualmente sobre la matriz experimental, pudiendo hacer la corrección de toda la matriz de datos o voltamperograma a voltamperograma siempre con cuidado de no introducir artefactos en la matriz resultante que dificultarían el posterior análisis de los datos.

1.1.2. Exploración de datos y clasificación de muestras

El análisis multivariante puede ser aplicado a matrices de grandes dimensiones de datos experimentales con multitud de variables y medidas con la finalidad de visualizar directamente la propia variación de los datos, o como paso previo de preprocesamiento para discriminar la información antes de la construcción de modelos de calibración o de clasificación. Un ejemplo sería la reducción de datos, ya que muchas veces existe una cierta correlación entre variables de manera que parte de la información resulta redundante [14].

El análisis por componentes principales (PCA) permite la reducción del espacio original manteniendo la información relevante de los datos. Los datos son descritos en unos nuevos ejes de coordenadas llamados componentes principales (PC), los cuales son combinaciones lineales de las variables originales. Estas nuevas variables matemáticas son ortogonales, es decir, no repiten información entre ellas. PCA permite la descripción de los datos originales con un número muy pequeño de componentes principales y, de esta manera, es posible visualizar matrices de datos de grandes dimensiones en el sistema espacial de componentes principales. Esta representación es mucho más eficiente gracias a que los nuevos ejes describen la dirección de la máxima varianza explicada de los datos en orden decreciente. El modelo de PCA se describe con la siguiente ecuación:

$$\mathbf{X}_{(m,n)} = \mathbf{T}_{(m,nc)} \mathbf{P}_{(nc,n)}^T \quad (\text{Ec. 1.1})$$

Donde \mathbf{X} es la matriz experimental, \mathbf{T} es la matriz de *scores* la cual describe las muestras en el espacio de los componentes principales, \mathbf{P} es la matriz de *loadings* la cual describe las variables en los ejes de componentes principales, m es el número de muestras, n es el número de variables y nc el número de componentes principales seleccionados.

La aplicación del PCA a los datos obtenidos con multisensores, como las lenguas y narices electrónicas, ha resultado ser extremadamente útil para un sinnúmero de aplicaciones, desde el seguimiento y detección de una gran variedad de analitos en todo tipo de matrices, hasta la detección de algunos microorganismos, o la clasificación e identificación de muestras de bebidas (té, vino, leche, refrescos,...), medicamentos, calidad del agua, etcétera [15-18].

1.1.3. Calibración multivariante

El uso de modelos de calibrado permite la determinación indirecta de una variable, por ejemplo la concentración, en muestras desconocidas a partir de las medidas experimentales. En los métodos de calibración lineal multivariante (MLR) se utiliza toda la medida experimental (vector), espectros en el caso de las medidas espectrofotométricas o voltamperogramas en el caso de medidas electroanalíticas. En este caso, la matriz de datos (**X**) tiene unas dimensiones de número de voltamperogramas obtenidos por número de potenciales utilizados en la medida de la intensidad. El hecho de utilizar toda la información del voltamperograma en lugar de sólo algún parámetro característico (por ejemplo, la intensidad máxima), por lo general se traduce en la obtención de mejores modelos de predicción. La ventaja del uso de MLR es la capacidad de determinar analitos en presencia de interferentes lo que hace que no sea necesario la utilización de sensores selectivos. Dependiendo de los algoritmos matemáticos utilizados para la descomposición de la matriz experimental existen diferentes métodos de calibración multivariante: mínimos cuadrados inversos (ILS), mínimos cuadrados clásicos (CLS), regresión por componentes principales (PCR), mínimos cuadrados parciales (PLS) y redes neuronales artificiales (ANN). Actualmente los métodos de calibración multivariante más utilizados en la química electroanalítica son el PLS y las ANN.

Mínimos Cuadrados Parciales (PLS)

PLS es un modelo que ofrece una gran versatilidad, ya que permite la calibración en muestras complejas, en donde las medidas pueden tener una contribución importante de interferentes y/o se han utilizado sensores poco selectivos. El método relaciona las

matrices \mathbf{X} (matriz de datos experimental) e \mathbf{Y} (matriz de variables a predecir) y para ello PLS descompone ambas matrices en sus factores:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP}^T \quad (\text{Ec. 1.2})$$

$$\mathbf{Y} = \mathbf{UQ}^T \quad (\text{Ec. 1.3})$$

Donde, \mathbf{X} se descompone en \mathbf{T} (matriz de *scores* de las respuestas experimentales) y \mathbf{P} (matriz de *loadings* de las respuestas experimentales). La matriz \mathbf{Y} se descompone en \mathbf{U} (matriz de *scores* de \mathbf{Y}) y \mathbf{Q} (matriz de *loadings* de \mathbf{Y}). Y a partir de estos se construye el modelo de regresión para calcular los coeficientes de regresión:

$$\mathbf{U} = \mathbf{TB} \quad (\text{Ec. 1.4})$$

Los componentes de PLS (matriz \mathbf{B}) se calculan en la dirección de la máxima covariancia explicada entre \mathbf{X} e \mathbf{Y} . Estos componentes que definen los nuevos ejes reciben el nombre de variables latentes.

En la bibliografía hay un gran número de ejemplos del uso de PLS en datos electroanalíticos. La aplicación de PLS ha permitido la resolución de datos voltamperométricos donde se produce la superposición de picos, e incluso cuando la corriente de fondo interfiere. Ha sido aplicado a la determinación de compuestos de interés químico, bioquímico, farmacéutico, clínico y medioambiental [19-23].

Artificial Neuronal Networks (ANN)

La aplicación de redes neuronales artificiales ha suscitado un gran interés en la química analítica ya que es un método de gran utilidad para la calibración tanto de sistemas lineales como no lineales [6]. Las ANN están inspiradas en las redes neuronales biológicas del cerebro humano. Éstas aprenden de la experiencia y abstraen las características principales de una serie de datos. Una red neuronal se compone de unidades llamadas neuronas. Cada neurona recibe una serie de entradas a través de interconexiones y emite una salida. Pero las neuronas además de los pesos y las conexiones tienen asociada una función matemática denominada función de transferencia. Dicha función genera la señal de salida de la neurona a partir de las señales de entrada [24].

Las ANN son herramientas de aprendizaje automático, capaces de aprender cualquier función continua y adecuada para el modelado del sistema. Una característica de las ANN es que pueden producir un gran número de modelos diferentes del mismo sistema, esto significa que son difíciles de optimizar, y por ello requieren un gran número de experimentos hasta conseguir un buen modelo de calibración, aunque la implementación de algoritmos genéticos ha incrementado la eficiencia en la optimización [25]. A pesar de la dificultad de la fase de aprendizaje, las ANN se están utilizando cada vez más para multitud de estudios, incluso en sistemas de equilibrio metal-ligando [26,27].

1.1.4. Identificación de modelos químicos

La quimiometría se puede aplicar también a la resolución de sistemas dinámicos múltiples, como los equilibrios de complejación metal-ligando. La determinación de un modelo de complejación en sistemas multicomponente se puede llevar a cabo mediante métodos quimiométricos de resolución multivariante de curvas (MCR). Estos métodos se basan en aislar, resolver y cuantificar las fuentes de variación de un conjunto de datos experimentales como un modelo aditivo de contribuciones de los componentes puros del sistema químico [28,29]. Una de las virtudes del MCR es que no se requiere apenas información previa sobre el número o la naturaleza de los componentes del sistema, aunque si se dispone de información, ésta puede ser utilizada para mejorar el análisis y comprensión de los datos. El único prerrequisito necesario para su aplicación es que la contribución de cada componente del sistema a la magnitud total medida ha de ser lineal [30].

El principio básico del MCR es la descomposición matemática de la matriz de datos experimental, que a partir de ahora llamaremos \mathbf{I} , en un producto de dos matrices ortogonales: la matriz de concentraciones \mathbf{C} y la matriz de espectros puros \mathbf{V}^T para un número preseleccionado de componentes (Ec. 1.5). \mathbf{C} y \mathbf{V}^T contienen los perfiles respuesta de cada componente asociados, respectivamente, a la variación de las filas y de las columnas de la matriz inicial de datos \mathbf{I} .

$$\mathbf{I}_{(m,n)} = \mathbf{C}_{(m,nc)} \mathbf{V}_{(nc,n)}^T + \mathbf{X} \quad (\text{Ec. 1.5})$$

Donde \mathbf{X} es la matriz residual que expresa la variación no explicada por el modelo, m es el número de medidas (voltamperogramas, espectros), n es el número de puntos de cada medida (potenciales, longitudes de onda) y nc el número de componentes utilizados. La diferencia entre la matriz experimental \mathbf{I} y la matriz reproducida \mathbf{I}_r , como el producto \mathbf{CV}^T , puede cuantificarse mediante la falta de ajuste o *lack of fit* que se define como:

$$lof (\%) = \sqrt{\frac{\sum_{ij} (I_{ij} - I_{r_{ij}})^2}{\sum_{ij} I_{ij}^2}} \times 100 \quad (\text{Ec. 1.6})$$

Donde I_{ij} y $I_{r_{ij}}$ son los elementos de la matriz experimental y reproducida, respectivamente.

En este punto, es crucial diferenciar el concepto componente cuando se aplica MCR a datos electroquímicos y a datos espectroscópicos. Para estos últimos datos, el concepto de componente está asociado a cada una de las especies químicas puras presentes en disolución, mientras que para los datos electroquímicos está asociado a un proceso electroquímico determinado, normalmente una reacción redox. No obstante, es posible que algunos fenómenos, tales como la adsorción de una especie en el electrodo o las corrientes capacitivas debido a la carga de la doble capa que se forma en la superficie del electrodo, o la propia línea base se puedan considerar como componentes [4,31,32]. Además, una única especie química puede proporcionar más de una respuesta instrumental, ya que, por ejemplo, si se forma un complejo mixto entre un péptido y dos metales diferentes, desde el punto de vista espectroscópico solo existe un componente, mientras que desde el electroquímico esta única especie química puede proporcionar, al menos, dos componentes, correspondientes a la reducción de cada uno de los dos iones metálicos en el electrodo.

La resolución de curvas multivariante optimizada mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS) es la metodología más utilizada en la identificación de modelos químicos en datos electroquímicos lineales. Debido a la gran importancia del MCR-ALS en el estudio de modelos químicos, especialmente relacionados con sistemas metal-ligando, en los cuales se centran los estudios en esta Tesis, en los siguientes apartados se explica de manera pormenorizada el funcionamiento del MCR-ALS, sus aplicaciones a sistemas complejantes, tipos de modelados y variantes.

1.2. Resolución multivariante de curvas mediante mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS)

El método de análisis multivariante MCR-ALS fue desarrollado en 1993 por R. Tauler et al. [33] para el tratamiento quimiométrico de datos espectroscópicos y ha demostrado ser también una potente herramienta para el estudio de equilibrios de complejación de metales. El proceso de optimización de las matrices \mathbf{C} y \mathbf{V}^T (ecuación 1.5) se lleva a cabo de manera iterativa mediante mínimos cuadrados alternados (Alternating Least Squares, ALS) a partir de una estimación inicial de \mathbf{C} o \mathbf{V}^T . Ambas matrices entran en un ciclo iterativo sin que ninguna tenga prioridad sobre la otra, finalizando el proceso al cumplirse un criterio de convergencia definido como el valor límite de la matriz \mathbf{X} (*lof*) o como un número máximo de iteraciones [30].

Cuando MCR-ALS se aplicó a datos electroanalíticos se incorporaron algunas modificaciones con el objetivo de adaptarlo a las características de los datos voltamperométricos [32]. La Figura 1 muestra un diagrama de flujo esquemático de la aplicación del MCR-ALS a los datos voltamperométricos. Las restricciones que se aplican durante el proceso iterativo son cualquier propiedad matemática o química que todo el sistema o algunos de sus componentes han de cumplir *sine qua non* [34]. Las restricciones sirven para minimizar la ambigüedad de los resultados obtenidos, al forzar la optimización de las matrices \mathbf{C} y \mathbf{V}^T según las condiciones deseadas.

Las restricciones son claves en el proceso iterativo para alcanzar resultados químicamente significativos, no sólo soluciones matemáticamente satisfactorias, y por tanto su aplicación debe ser coherente y con convencimiento de su validez ya que determinará el resultado. Si las restricciones se aplican correctamente no causan ningún efecto sobre la fase final del proceso de optimización.

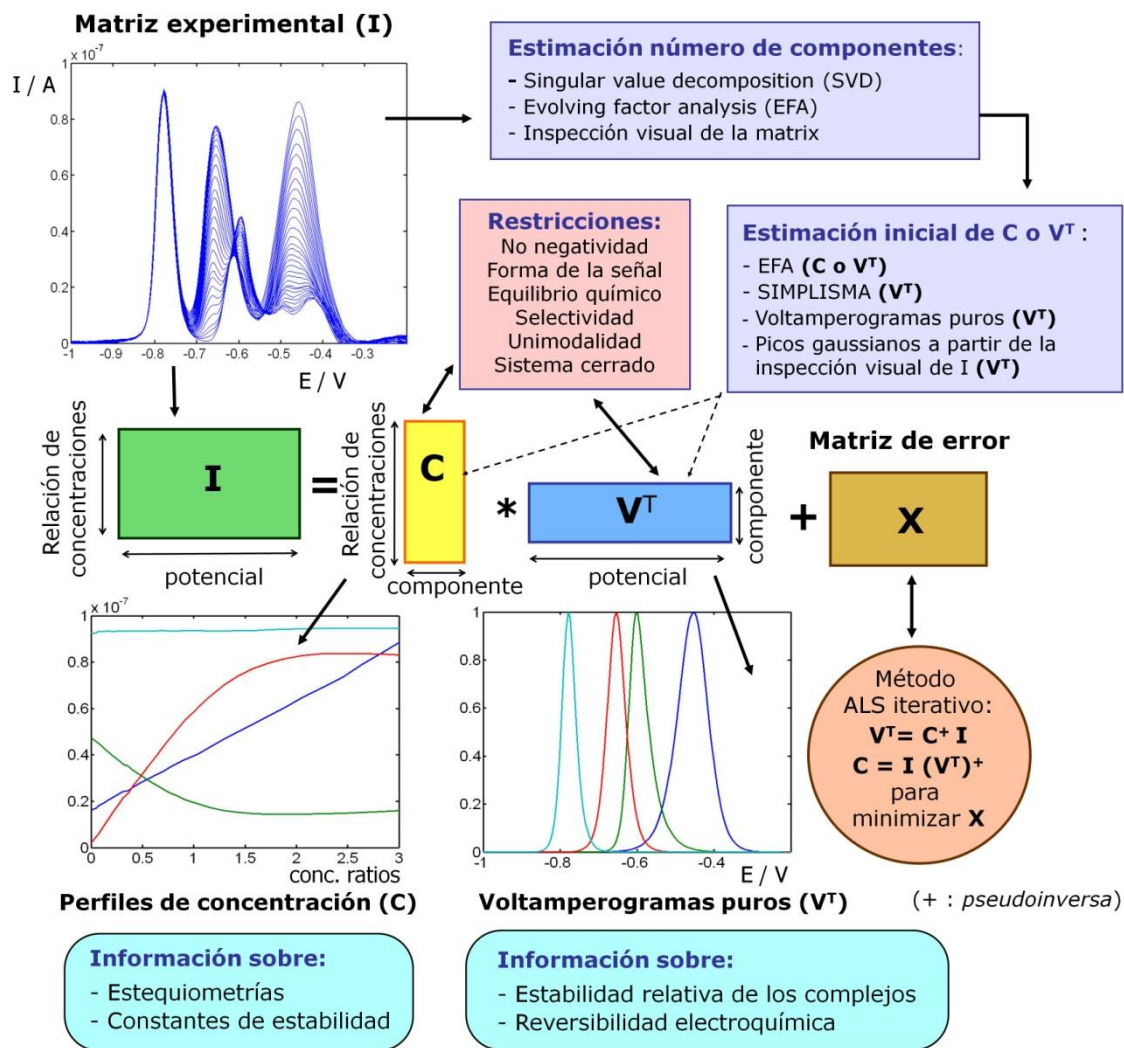


Figura 1. Diagrama de flujo de la aplicación del método MCR-ALS a datos voltamperométricos de complejación.

Las restricciones más frecuentes son:

- *No negatividad*: se aplica para obligar a que cualquier valor de un perfil respuesta sea positivo durante el proceso iterativo. Se aplica a todos los perfiles de concentración y a muchas respuestas experimentales como los voltamperogramas.
- *Unimodalidad*: esta restricción impone la existencia de un único máximo para cada perfil de respuesta. Se aplica a los voltamperogramas para asegurarse de que no contengan hombros o doubles picos de altura superior a un determinado grado de libertad, normalmente un 5% del valor máximo.

- *Crecimiento/decrecimiento monótonico*: esta restricción se aplica a aquellos componentes cuyos perfiles de concentración sean crecientes o decrecientes desde su origen hasta el final de la valoración. Para asegurar la tendencia, se calcula para cada punto la primera derivada mediante el método de Savitzky-Golay y se restringe su signo. En caso de que un punto tenga la derivada de signo contrario al anterior, se igualan sus valores.
- *Restricción de forma*: se aplica a la matriz de voltamperogramas unitarios para que estos se ajusten a una ecuación paramétrica determinada que se optimiza en cada nueva iteración. Estas funciones de pico describen, como es natural, la forma típica de los voltamperogramas diferenciales sin basarse en parámetros electroquímicos, sino puramente numéricos [35].
- *Equilibrio químico*: esta restricción se basa en el ajuste de una serie de constantes de complejación a los perfiles de concentración que son obtenidos sucesivamente mediante ALS. La aplicación de esta restricción sí requiere la presunción de un posible modelo de complejación como, por ejemplo, el número y la estequiometría de los complejos que se forman, así como la estimación inicial del valor de sus constantes de complejación [36].
- *Sistema cerrado*: es la aplicación de un balance de materia, por lo que se necesita que todas las especies existentes sean detectables mediante la técnica de estudio. En voltamperometría, esto significa que todas las especies que contienen un determinado analito (M y/o L) son electroactivas, y que la suma de sus concentraciones en cada paso de la valoración es constante.
- *Selectividad*: A diferencia de las restricciones explicadas hasta ahora, la selectividad está relacionada con la estructura interna de los datos y no con la naturaleza química del sistema. Esta restricción hace referencia a aquellas zonas de las matrices \mathbf{C} o \mathbf{V}^T donde sólo un componente está presente como, por ejemplo, el principio de una valoración.

Estas restricciones otorgan un significado químico a las dos matrices resultantes, convirtiendo al MCR-ALS en una herramienta muy poderosa para el estudio de los equilibrios de complejación. Por lo que respecta a su aplicación a valoraciones complexométricas estudiadas mediante una técnica voltamperométrica, la matriz \mathbf{C}

resultante contiene los perfiles de concentración, mientras que la matriz \mathbf{V}^T contiene los voltamperogramas unitarios para cada componente del sistema. De la matriz \mathbf{C} es posible deducir información sobre la evolución de los diferentes procesos electroquímicos y, por tanto, de las diferentes especies existentes durante el experimento. De la matriz \mathbf{V}^T se puede obtener información acerca de las características de los procesos implicados a partir de su posición en el eje de potenciales.

Por último, una vez efectuada la factorización se analizan conjuntamente ambas matrices resultantes, se puede proponer un esquema electroquímico y deducir un modelo de complejación que contenga la máxima información sobre las diferentes especies químicas, así como la estabilidad relativa de los enlaces de los iones metálicos con el ligando, y algunas indicaciones sobre la reversibilidad de los diferentes procesos electroquímicos. La aplicación del MCR-ALS ha permitido la resolución de una gran cantidad y variedad de sistemas metal-ligando [32,35-39].

En muchas valoraciones y determinaciones voltamperométricas existe un alto grado de solapamiento de señales comprometiendo la aplicación de MCR-ALS. Con el fin de resolver estos sistemas e incrementar el poder de resolución de esta metodología se pueden combinar varias matrices obtenidas para un mismo sistema mediante diferentes técnicas voltamperométricas [40,41] o incluso por diversas técnicas analíticas [42] para su análisis simultáneo. Las matrices se pueden combinar en la dirección de las filas, de las columnas o de ambas a la vez.

1.2.1. *Hard y Soft modelling*

La aproximación clásica y más habitual de extraer información de datos electroquímicos es a partir del ajuste de un modelo electroquímico preestablecido a unos datos experimentales. Esta metodología, conocida con el nombre de *hard modelling* (modelado duro o rígido), puede ser aplicada a sistemas sencillos, donde las señales estén bien separadas y se conoce de manera rigurosa el comportamiento electroquímico.

En esta metodología (*hard modelling*) se postula un modelo teórico considerando tanto los procesos de complejación en el seno de la disolución como los procesos que ocurren en la capa de difusión y en la superficie del electrodo, así como el cumplimiento de una serie de hipótesis, entre ellas: reacción electródica reversible, transporte de materia

controlado por difusión, formación de complejos electroquímicamente lábiles, exceso de ligando respecto del ion metálico, cambios en la intensidad y/o potencial suficientemente grandes y medibles con precisión, ausencia de fenómenos de adsorción o adsorción inducida sobre la superficie del electrodo.

Esta metodología engloba tres etapas:

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

Para sistemas de complejación de iones metálicos destacan el método de DeFord y Hume [43], aplicable a la complejación de un metal y un ligando sencillo que da lugar a complejos lábiles sucesivos, y el de De Jong et al. [44-46], aplicable a la complejación de un metal y un ligando macromolecular que forman complejos 1:1 entre el metal y cada una de las posiciones complejantes.

No obstante, en muchos casos la presencia de fenómenos de adsorción electródica, la formación de complejos con cinéticas de asociación/disociación lentas desde el punto de vista electroquímico y/o voltamperogramas con solapamiento de diversas señales impide la aplicación del *hard modelling*. En estos casos, se utilizan metodologías quimiométricas que permitan la extracción de información a partir de los datos numéricos y del análisis estadístico de los datos experimentales sin la asunción de un modelo de complejación, lo que constituye una aproximación a la resolución de problemas electroquímicos, llamado *soft modelling* (modelado blando). En general este tipo de modelado de datos está basado en el uso de varios métodos computacionales y estadísticos con la finalidad de aislar las fuentes de variación de los datos experimentales. Es esencial no restringir las teorías, modelos o perspectivas del sistema antes de su aplicación, aunque también es muy importante analizar los resultados desde el conocimiento previo del sistema y de las especies químicas que intervienen.

El *soft modelling* ha demostrado ser muy útil para estudios de complejación de moléculas naturales cuyo comportamiento es complicado debido a la naturaleza de los procesos electroquímicos presentes. En los estudios de complejación este modelado permite la determinación de perfiles de concentración y de las señales puras para cada proceso electroquímico mediante el análisis de la variación de las señales a diferentes relaciones metal-ligando.

1.3. Limitaciones de MCR en el tratamiento de datos electroquímicos

1.3.1. Ambigüedades en el tratamiento de datos electroanalíticos

Las soluciones obtenidas tras el análisis por MCR vienen asociadas a la resolución de diversas fuentes de incertidumbre como son el error experimental, el ruido instrumental, y ciertas ambigüedades. La aplicación de los métodos de MCR tiene inconvenientes que pueden resumirse como la dificultad intrínseca de encontrar una solución única para explicar los datos experimentales medidos y que esta solución sea la correcta [47].

Se diferencian tres tipos de ambigüedades en los métodos de MCR [48]:

- *Ambigüedades de permutación*: hacen referencia al orden intercambiable de los componentes en las filas y las columnas de las matrices resueltas por el modelo bilineal. Este tipo de ambigüedades son fácilmente controlables.
- *Ambigüedades de intensidad*: hacen alusión a la indeterminación de la escala de la matriz descrita por el modelo bilineal. Estas ambigüedades pueden ser eliminadas con información previamente conocida mediante una calibración externa o la fijación de forma arbitraria del tamaño o la escala de una de las dos matrices (por ejemplo, la fijación del área o la altura del perfil de respuesta de cada componente).
- *Ambigüedades de rotación*: es la fuente principal de ambigüedad y el problema más importante en la resolución de sistemas mediante métodos de MCR. La ambigüedad de tipo rotacional es la razón principal de que no existan soluciones únicas y ocurre cuando no existe selectividad para alguno de los componentes. El cumplimiento de restricciones e información externa sobre el sistema ayuda a

solventar estas ambigüedades, y en consecuencia, a reducir el número de soluciones posibles.

La presencia de ambigüedades rotacionales en sistemas poco selectivos y las soluciones no únicas en resultados MCR reduce su fiabilidad y dificulta la evaluación de los datos siempre y cuando estos problemas no se tengan en cuenta. A pesar de que la existencia de diferentes resultados para un mismo problema es algo intrínseco en los métodos de MCR, este inconveniente puede ser mitigado, o solucionado en algunos casos, por medio de un uso inteligente de la estructura de los datos y de la aplicación de las restricciones apropiadas.

1.3.2. Metodologías MCR para el tratamiento de datos no lineales

Como ya hemos explicado con anterioridad, la aplicación de la metodología MCR-ALS viene condicionada a la linealidad de los datos. Sin embargo, la complejidad de la naturaleza de los datos voltamperométricos, la cinética de las reacciones electroquímicas y la ventana de tiempo de la medida son algunos de los factores que pueden afectar dramáticamente dicha linealidad. La cinética de las reacciones electroquímicas puede modificarse por el pH y la fuerza iónica. Finalmente, hay que señalar también que cambios durante los procesos de reducción de las especies no sólo pueden acarrear un cambio en el potencial sino un ensanchamiento de las señales y, en consecuencia, una pérdida de linealidad, la cual se traduce en un aumento del *lof* y del número de componentes necesarios para explicar el comportamiento del sistema.

Shiftfit

Estos comportamientos no lineales dificultan o imposibilitan la aplicación del MCR-ALS y la correcta resolución de los datos. Un ejemplo de esta pérdida de linealidad causada por el desplazamiento de las señales en el eje de potenciales se observó durante el estudio de los complejos de Pb(II) con fitoquelatinas. Para solventar el problema se desarrolló un programa, que se llamó *shiftfit* [49,50], que permite corregir los desplazamientos de potencial y de esta manera obtener una matriz de datos lineales para la posterior aplicación de la metodología MCR-ALS.

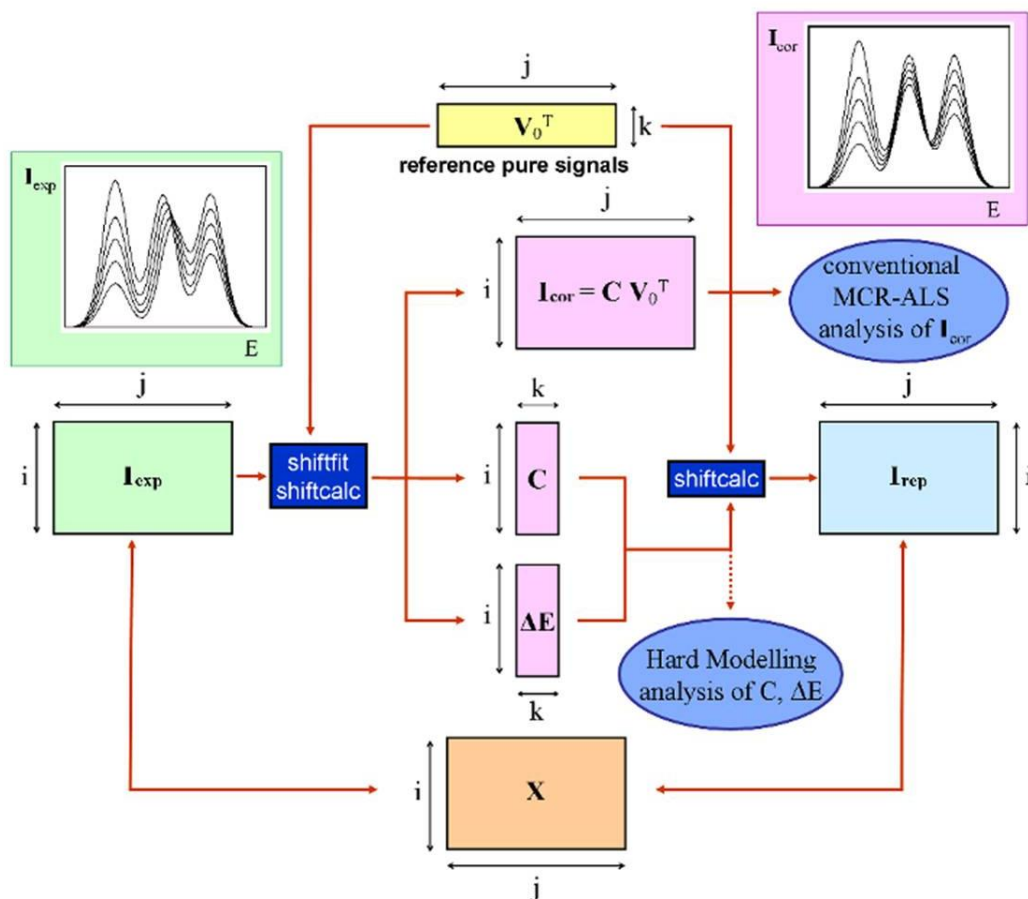


Figura 2. Diagrama de flujo de la corrección de potencial mediante el programa *shiftfit* que utiliza las funciones *shiftfit* y *shiftcalc* [49].

Para llevar a cabo la corrección del desplazamiento, tras hacer una estimación visual de los voltamperogramas puros V_0 , se seleccionan los componentes que muestran desplazamiento (se definen con 1 si se mueven o con 0 si se mantienen fijos en el eje de potencial) y se ejecuta el programa. A continuación, a partir de la matriz experimental I_{exp} comienza una etapa en la que, voltamperograma a voltamperograma, mediante una subrutina del *shiftfit*, llamada *shiftcalc*, se determinan los desplazamientos de potencial de cada señal a partir de la posición de su máximo en relación a la estimación inicial V_0 de referencia. En este momento se crea una matriz $V_{shift,i}$ que contiene los voltamperogramas unitarios puros de V_0 pero desplazados por interpolación según una matriz $\Delta E_{o,i}$. En este punto se optimizan mediante la función *shiftfit* por mínimos cuadrados no lineales las matrices V_{shift} y ΔE hasta un criterio de convergencia el cual se define para el valor mínimo de la diferencia entre la matriz experimental I_{exp} y la matriz reproducida I_{rep} o para un número máximo de iteraciones. Una vez finalizada la

etapa de iteración se calcula para cada voltamperograma una matriz $\mathbf{C}_i = \mathbf{I}_{\text{exp},i}[(\mathbf{V}_{\text{shift},i})^T]^+$ como estimación de los perfiles de concentración para los componentes una vez desplazados, la matriz reproducida \mathbf{I}_{rep} y la falta de ajuste (Figura 2).

Tras la aplicación del *shiftfit* a una matriz experimental se obtiene, por una parte, una matriz de señales corregidas \mathbf{I}_{cor} con una linealidad incrementada de los datos experimentales que la componen y que puede ser analizada posteriormente por MCR-ALS y, por otra, una matriz $\Delta\mathbf{E}$ que incluye, para cada adición y componente, los valores optimizados del desplazamiento de potencial, de forma que se puedan utilizar para ajustarlos a algún modelo electroquímico siguiendo la metodología de *hard modelling*. El método fue aplicado con éxito a varios sistemas como son el Cd(II)-glutación, el Zn(II)-glicina y el Pb(II)-fitoquelatina (PC₃) [49,50].

pHfit

Posteriormente al *shiftfit* se desarrolló el programa *pHfit* [51]. Este programa se planteó como un nuevo enfoque del tratamiento mediante resolución de curvas multivariante (MCR) de datos voltamperométricos no lineales, correspondientes a valoraciones de mezclas metal-ligando en función del pH cuyas señales se desplazan progresivamente en el eje de potencial debido a la evolución de los complejos con el pH. Estas señales de reducción reversibles se mueven a causa de la participación de H⁺ en las reacciones electroquímicas produciendo una pérdida de la linealidad.

pHfit se fundamenta en el uso de voltamperogramas puros de cualquier forma, los cuales se mantienen constantes a lo largo del análisis a excepción de la altura y posición, que son optimizados mediante mínimos cuadrados, pero no fila por fila. En este caso, los potenciales de pico se ajustan frente al pH mediante los parámetros de una función lineal o sigmoidea (ecuaciones 1.7 y 1.8, respectivamente). Todo ello se hace mediante la descomposición de la matriz de datos \mathbf{I}_{exp} en una matriz de perfiles de concentración \mathbf{C} y una matriz de señales unitarias \mathbf{V}_0 , de manera similar al algoritmo mínimos cuadrados alternados MCR-ALS.

$$E_p = k - 0.058 \frac{m}{n} \text{pH} \quad (\text{Ec. 1.7})$$

$$\Delta E = \frac{a}{1 + e^{b(\text{pH} - c)}} + d \quad (\text{Ec. 1.8})$$

Donde para la Ec. 1.7, E_p es el potencial de pico, siendo k una constante relacionada con el potencial de reducción formal del ion metálico, m y n es el número de protones y electrones que intervienen en la reacción electroquímica, respectivamente. Y para la Ec. 1.8, a , b , c , d son los parámetros que definen la forma de la función gaussiana y ΔE la diferencia de potenciales. En la corrección de los desplazamientos de potencial se pueden diferenciar, y por tanto, ajustar diferentes comportamientos de las señales (inmóviles o que evolucionan linealmente o sigmoidalmente).

El diagrama del funcionamiento del programa *pHfit* junto a todas las iteraciones, parámetros y matrices involucradas en el proceso se puede ver en la Figura 3. Los parámetros optimizados a partir de la evolución de las señales respecto a los cambios de pH, proporcionan información valiosa sobre los procesos de formación de complejos y su reducción.

En ambos ajustes se obtiene una pendiente que permite calcular, a partir de la ecuación (1.7) la relación entre electrones y protones intercambiados. En el ajuste sigmoideo se obtiene un parámetro adicional, que es el punto de inflexión c , el cual se puede utilizar para relacionarlo con los valores de pK_a de los grupos funcionales implicados en la unión del ligando con el metal. Esta metodología fue aplicada con éxito a diferentes sistemas metal-ligando como el del Cd(II) con ácido nitrilotriacético y el del Cd(II) con glutatión, algún fragmento de éste y algunas fitoquelatinas [51].

Para concluir el Capítulo 1, hay que señalar que existen casos donde la pérdida de linealidad es suficientemente pronunciada como para no poder aplicar directamente MCR-ALS. En estos casos, programas y metodologías como *shiftfit* y *pHfit* pueden linealizar o tratar directamente los datos voltamperométricos no lineales, pero sólo si las señales al desplazarse mantienen su forma a lo largo de todo el experimento. Cambios en la forma o simetría de las señales unitarias (típicamente causados por una disminución progresiva de la reversibilidad electroquímica) provocan un aumento dramático de la no linealidad, que no puede ser tratada ni por *shiftfit*, ni *pHfit*. En este punto es donde se centra una parte de los objetivos de esta Tesis, en donde se propone una nueva metodología de MCR basada en el ajuste paramétrico de funciones gaussianas a las señales voltamperométricas para así poder tratar quimiométricamente datos voltamperométricos no lineales, independientemente de la naturaleza de la no linealidad.

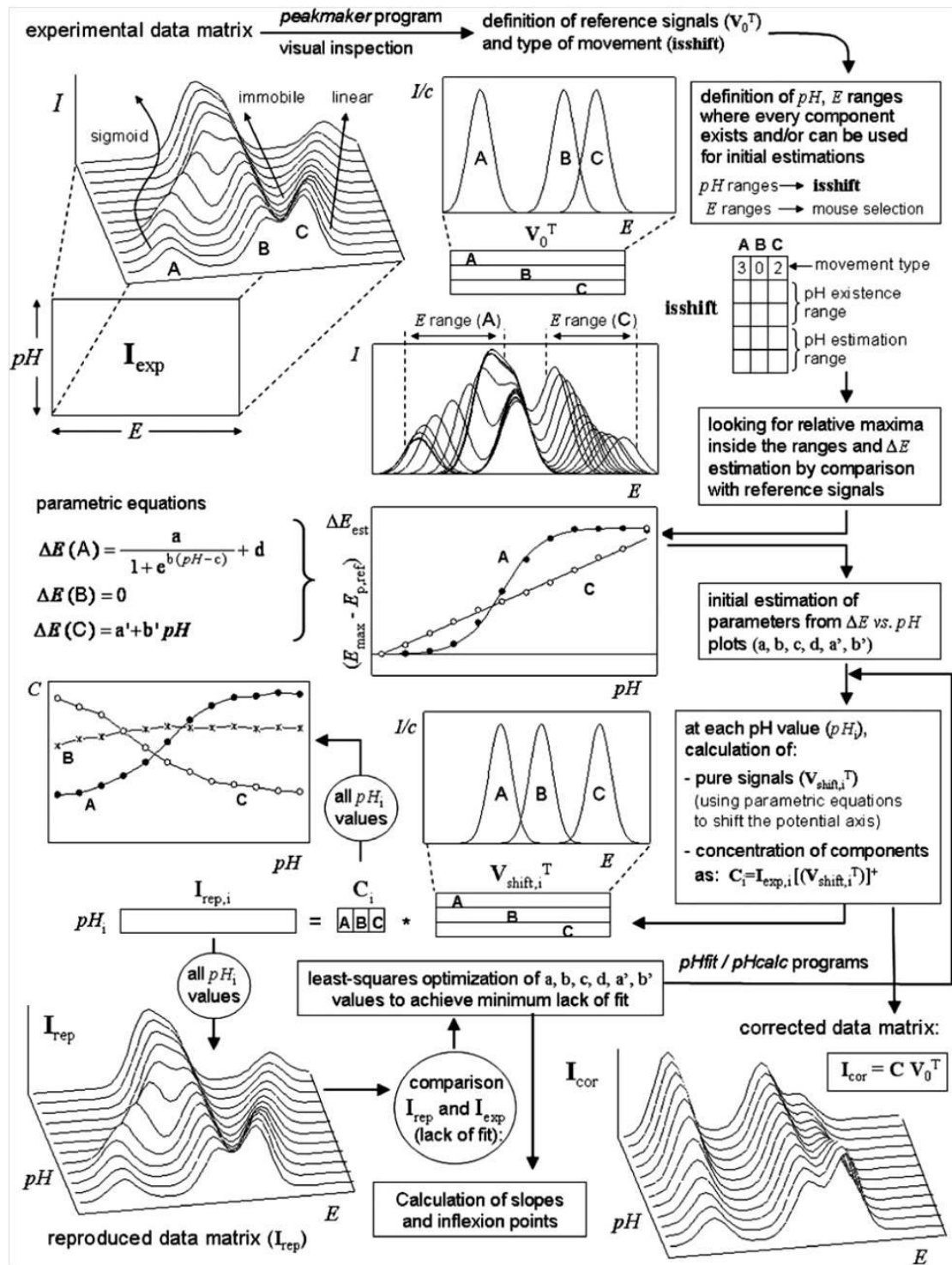


Figura 3. Diagrama de flujo del funcionamiento de *pHfit* aplicado a datos voltamperométricos [51].

Capítulo 2

Sistemas estudiados

En este capítulo se explican algunas generalidades de los metales pesados utilizados en esta Tesis, así como sus implicaciones en los diferentes sistemas de interés biológico y medioambiental analizados. Tras una breve introducción sobre metales pesados, se explican las principales características y efectos del arsénico, cadmio, cobre y plomo que son los metales y metaloides estudiados en esta Tesis, se definen las teorías y modelos que rigen la interacción, estabilidad y selectividad de sus complejos. Finalmente, se consideran los tres sistemas estudiados (fitoquelatinas-metales pesados, agentes quelantes-arsénico y bencilaminopurina-cobre) y se incide en la importancia del binomio metal-sistema para una mayor comprensión a nivel biológico de la formación de los complejos y sus funciones.

2.1. Metales pesados

El término "metales pesados" se ha utilizado cada vez más en publicaciones científicas y en la legislación relacionada con los peligros químicos y el uso seguro de productos químicos. A menudo se utiliza como nombre del grupo de metales y semimetales (metaloideos) que están relacionados con determinados efectos de contaminación ambiental, toxicidad y ecotoxicidad.

Los iones de estos metales tienen entre 10 y 12 electrones en los orbitales *d* y sus cationes son muy polarizables. En consecuencia tienden a formar enlaces casi covalentes. Algunos metales de este grupo de elementos químicos (As, Cd, Hg, Pb, Cr, Sn,...) son tóxicos, incluso a muy bajas concentraciones, aunque hay otros como el Cu, Zn, Co,..., que a nivel de traza son esenciales para la vida [52,53]. No obstante pequeñas variaciones en las concentraciones de estos últimos pueden producir efectos nocivos, agudos, crónicos e incluso mortales para los seres vivos. La toxicidad de todos los metales pesados depende mucho de la forma química del elemento, es decir, de su especiación [52]. Los mecanismos que hacen que estos metales sean tóxicos están relacionados con la fuerte afinidad que tienen sus cationes metálicos por los grupos funcionales de biomoléculas involucradas en diferentes funciones en el organismo y que, en consecuencia, se ven alteradas. Otra de sus características más significativas es la persistencia en el medio ambiente y la capacidad de acumularse y magnificarse a lo largo de la cadena trófica.

Las concentraciones anómalas de metales pesados en el medio pueden ser debidas a causas naturales o antropogénicas. Las causas naturales pueden ser la actividad volcánica, la erosión de rocas, los procesos de formación de suelos, entre otras. Las causas antropogénicas son la minería, la combustión de carburantes fósiles, la industria a través de vertidos, emisiones, residuos (incineración, depósito), etcétera.

Los metales tóxicos estudiados en la presente Tesis han sido el arsénico, el cobre, el cadmio y el plomo. A continuación se detallan sus principales características.

2.1.1. Arsénico

El arsénico (As) y sus compuestos son extremadamente tóxicos, especialmente en su forma inorgánica. El As es un metaloide, lo que significa que tiene características tanto de metal como de no-metal, aunque debido a su toxicidad se engloba dentro de los metales pesados [54]. El As está presente de forma natural a niveles altos en las aguas subterráneas de varios países (Argentina, Bangladesh, Chile, China, India, México y los Estados Unidos de América) y es una gran amenaza para las personas que utilizan estas aguas para beber, preparar alimentos o regar cultivos. La WHO (World Health Organization) lo considera una de las 10 sustancias químicas más preocupantes para la salud pública [55]. Así, por ejemplo, en Bangladesh se produjo la mayor intoxicación masiva de la historia, debido a la construcción de infinidad de pozos de agua que resultaron estar contaminados, afectando a cientos de miles de personas [56]. Se conocen compuestos de arsénico desde la antigüedad, siendo extremadamente tóxicos, aunque se empleaban como componentes de algunos medicamentos. De hecho, médicos árabes usaron compuestos de arsénico en fumigaciones, píldoras y pociones. En el siglo XVIII los compuestos arsenicales consiguieron un puesto de primer orden en algunas terapias hasta que fueron sustituidos por las sulfamidas y los antibióticos.

El arsénico se puede encontrar en forma nativa en la naturaleza aunque principalmente está en forma de sulfuro o combinado con otros metales como hierro, níquel, cobalto, entre otros. El As tiene diversos usos industriales como preservantes de madera, en materiales semiconductores, LED, diodos láser, pigmentos, pirotecnia, decolorantes del vidrio y hasta hace unas décadas como insecticida.

El arsénico se encuentra en pequeñas cantidades en todos los seres vivos, y en todo los medios de la naturaleza. El arsénico no puede ser destruido en el medio ambiente, solamente puede modificarse y pasar al aire, al agua, a los suelos. El viento puede transportarlo en forma de polvo hasta llegar a disolverse en agua de lluvia o en el agua que se filtra a través del suelo. Los peces y mariscos pueden acumular arsénico mayoritariamente en una forma orgánica llamada arsenobetaína, que es mucho menos tóxica. Muchos compuestos de arsénico pueden disolverse en agua aunque la mayor parte termina eventualmente en el suelo o en el sedimento [57].

La Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (IARC) cita evidencias suficientes de una relación entre la exposición al arsénico, fundamentalmente sus

formas inorgánicas, con el cáncer humano, clasificando el arsénico en el Grupo 1 de agentes cancerígenos [58]. El envenenamiento por arsénico generalmente resulta de la ingestión de agua contaminada, pero también puede ocurrir inhalando serrín o quemando madera que ha sido tratada con arsénico, o viviendo en áreas con niveles naturales altos de arsénico. Los síntomas inmediatos de una intoxicación aguda por arsénico incluyen vómitos, dolor abdominal y diarrea. Seguidamente, aparecen otros efectos, como entumecimiento en las manos y los pies, calambres musculares lesiones cutáneas, cáncer y, en casos extremos, la muerte [55]. También se ha asociado a problemas de desarrollo, enfermedades cardiovasculares, neurotoxicidad y diabetes.

2.1.2. Cadmio

El cadmio (Cd) es un metal que no se encuentra en la naturaleza en forma elemental ni en concentraciones suficientes en minerales para tener su propia minería. Éste siempre se obtiene como un producto secundario en la extracción, normalmente del zinc. Esto es debido a que el cadmio se encuentra en el mismo subgrupo de la tabla periódica que el zinc y el mercurio, pero es más similar al primero y por ello se encuentran, habitualmente, juntos en la naturaleza. La solubilidad del cadmio depende de la acidez del medio pudiendo estar en diferentes formas pero principalmente se encuentra como ion metálico libre Cd^{2+} [59].

La forma más común en la naturaleza del cadmio es el sulfuro de cadmio (CdS). Durante la erosión este compuesto entra en el medio en su forma soluble Cd^{2+} . Los factores más influyentes que controlan su movilidad en el medio ambiente son el pH y el potencial redox. Es capaz de formar hidróxidos, cloruros y complejos con amonio y cianuro, a la par de complejarse con la materia húmica o ligandos tanto sintéticos como naturales. Además el ion libre es capaz de formar complejos blancos insolubles con carbonatos, arseniatos, fosfatos, oxalatos,...

A pesar de ser un metal muy tóxico, el cadmio se considera un elemento importante debido a sus múltiples aplicaciones, las cuales no dejan de ser posibles fuentes de contaminación de origen antropogénico. Sus usos industriales son: utilización en los procesos de galvanizado de metales y aleaciones; protector contra la corrosión; manufactura de pigmentos y fabricación de pinturas y colorantes para el caucho;

utilización en baterías; estabilizador de plásticos; además de usos agrícolas en fertilizantes fosfatados y pesticidas que contienen cadmio.

En el valle del río Jinzu (Japón) fue el lugar donde se produjo el caso más grave de contaminación por Cd. En este lugar los campos de arroz utilizados en el consumo local fueron regados de forma continua por un río contaminado por cadmio. Cientos de personas se vieron afectadas y contrajeron una enfermedad degenerativa en los huesos, llamada itai-itai, que en japonés significa ¡ay, ay!, llamado así por los gritos de dolor que emitían los afectados. Esta enfermedad se produce porque los iones Cd^{2+} reemplazan los iones Ca^{2+} de los huesos debido a que poseen casi la misma relación carga/radio y, como consecuencia, los huesos se vuelven porosos y se pueden producir múltiples fracturas, alteraciones combinadas con osteoporosis y osteomalacia, daño renal, enfisema y anemia [60].

IARC considera el cadmio como un agente cancerígeno y lo clasifica en el Grupo 1 [58]. Las personas con exposición ocupacional al cadmio tienen un elevado riesgo de desarrollar cáncer de pulmón por aspiración de este elemento. Por ello existen multitud de normativas que regulan las concentraciones de éste en diferentes medios.

2.1.3. Cobre

El cobre (Cu) es un oligoelemento, es decir, esencial para la vida. Este metal tiene un papel fundamental en diferentes funciones biológicas tanto en la flora como en la fauna. En las plantas el Cu es fundamental para el proceso de la fotosíntesis, la deficiencia de éste hace que las plantas enfermen pudiendo ocasionar daños económicos en la actividad agrícola. También en los humanos el Cu es imprescindible ya que contribuye a la formación de glóbulos rojos y ayuda a mantener los vasos sanguíneos, los nervios, el sistema inmunitario y los huesos, además de ser necesario para el funcionamiento de muchas enzimas. A pesar de que el cobre es vital para los organismos, su exceso puede provocar efectos tóxicos [61].

El cobre es un metal abundante en la naturaleza, se puede encontrar en forma nativa junto a bolsas de sus minerales explotándose en minas a cielo abierto. Las formas predominantes son los sulfuros (Cu_2S y CuS) y los óxidos (CuO). El cobre es un metal con una multitud de propiedades tanto físicas como mecánicas relevantes y esto hace

que tenga una gran variedad de usos industriales, siendo el tercer metal, después del hierro y del aluminio, más consumido en el mundo [54]. El cobre es un metal blando el cual posee muy buena ductilidad, maleabilidad, admite procesos de soldadura, es fácil de mecanizar y su característica más relevante es que es el metal con mayor conductividad eléctrica y térmica después de la plata.

La extracción, producción y uso de cobre se ha incrementado en las últimas décadas y debido a esto sus cantidades han aumentado en el medio ambiente. El Cu es fácilmente soluble en medios ácidos aunque precipita fácilmente en presencia de sulfuros, carbonatos o hidróxidos. La forma más móvil es el ion Cu^{2+} aunque en el suelo se encuentra en diferentes formas iónicas (HCuO_2^- , CuOH^+ , $\text{Cu}(\text{OH})_2^{2+}$, ...) decreciendo la solubilidad de éstas a pH superiores a 7-8. El Cu es fuertemente retenido tanto en la materia orgánica como inorgánica mediante procesos de adsorción, precipitación, formación de complejos orgánicos y fijación microbiana. Esto hace que el cobre tenga muy poca movilidad haciendo difícil que llegue a aguas subterráneas. En el agua superficial, el cobre puede viajar largas distancias, tanto suspendido sobre las partículas de lodos como en forma de iones libres [62].

La absorción de cobre es necesaria para el organismo y por ello lo ingerimos en los alimentos, lo bebemos en el agua potable y lo respiramos en el aire. Pero aunque lo necesitemos, concentraciones elevadas convierten al cobre en un tóxico que causa problemas en la salud, pudiendo conducir a hepatitis, problemas renales, trastornos cerebrales y otros problemas. También hay que señalar que un déficit en el consumo de cobre es también dañino, pudiendo producir anemia y osteoporosis. El Comité de Nutrición y Alimentos del Instituto de Medicina recomienda un consumo de 900 μg de cobre/día en la dieta para adultos [63].

2.1.4. Plomo

El plomo (Pb) es un elemento químico sin función biológica conocida y con la propiedad de acumularse en el organismo. En la naturaleza se encuentra principalmente en forma de tres minerales: galena (PbS), cerusita (PbCO_3) y anglesita (PbSO_4). Su biodisponibilidad está fuertemente influenciada por el pH, las condiciones redox y las concentraciones relativas de otros iones presentes en la disolución acuosa del suelo.

Aun así, el plomo es probablemente el menos móvil de los metales pesados y presenta una mínima penetración vertical debido a la baja degradación microbiana y a que las formas solubles de plomo pasan rápidamente a especies más insolubles y éstas quedan mayoritariamente inmovilizadas gracias al intercambio iónico y a su complejación con la materia orgánica [64].

El plomo es uno de los metales más antiguos que se conocen y de los primeros en ser empleado por el hombre. Se obtiene a partir de sus minerales, principalmente como sulfuro de plomo. En la Edad Antigua se obtenía fácilmente por reducción de sus óxidos con carbón a temperaturas relativamente bajas. Muy utilizado como material de construcción debido a la facilidad en su obtención y sus características como una altísima densidad, maleabilidad, ductilidad y resistencia a la corrosión. En la actualidad el plomo sigue siendo muy empleado, de hecho es el cuarto metal no férreo más utilizado industrialmente. Los principales usos del plomo y sus compuestos en la actualidad son: la fabricación de baterías y acumuladores, la construcción, cubiertas para cableado de alta resistencia a la corrosión, la protección de radiadores y la fabricación de munición y de pigmentos. Actualmente, se está substituyendo el plomo por otros elementos debido a su toxicidad [54].

El envenenamiento por Pb generalmente resulta de la ingestión de alimentos o agua contaminada con plomo, pero también puede ocurrir después de una ingestión accidental. Una vez absorbido, el plomo entra en el torrente sanguíneo donde se enlaza a los glóbulos rojos y otras proteínas depositándose finalmente en los huesos tras la substitución del calcio. En la actualidad se considera que el plomo origina dos clases de efectos tóxicos bien diferenciados, los que afectan al sistema nervioso central (de índole conductual y cognitiva, especialmente en niños pequeños) y los que afectan al resto de funciones fisiológicas (siendo los sistemas más críticos el hematológico, renal y nervioso periférico). La IARC ha clasificado los compuestos inorgánicos de plomo como probables cancerígenos para los humanos (Grupo 2A), basándose en algunas pruebas de carcinogenicidad en seres humanos y suficientes evidencias en animales [58].

2.2. Interacción de los metales con otras especies químicas

La determinación del patrón de comportamiento, las interacciones con otros compuestos y la formación de ciertas especies en que pueden estar los metales son decisivas para la comprensión de sus funciones y sus efectos en los medios biológicos y naturales.

2.2.1. Formación, estabilidad y selectividad de complejos.

Conocer el comportamiento químico de los metales y la formación de ciertas especies es muy importante para la comprensión de los efectos y el papel biológico de estos. Existen diferentes teorías que explican las propiedades de los elementos de transición, las cuales se explican brevemente a continuación.

Los elementos de transición están relacionados con la teoría de coordinación de Werner. Esta teoría postula que los metales poseen un número de coordinación (el número de ligandos enlazados) determinado, y que estos números no son necesariamente iguales al estado de oxidación del ión metálico. Posteriormente, a esta teoría se vio que los ligandos se organizaban en el espacio en geometrías definidas (octaédrica, cuadrada plana, etc.), y que el metal poseía dos valencias: la primaria (que corresponde a su estado de oxidación) y la secundaria (que corresponde al número de coordinación) [54,65].

La formación de los complejos metálicos se explica por la teoría de Pearson, donde el ión del metal desempeña el papel de ácido de Lewis, el cual se enlaza con una base de Lewis, que por definición posee uno o más pares solitarios de electrones y al enlazarse con el metal, que se llama ligando. El conjunto de un ion metálico enlazado con uno o más ligandos se denomina complejo.

La preferencia de ciertos metales por algunos ligandos, o viceversa, permite predecir la estabilidad de los complejos, hecho que también se explica mediante la teoría de Pearson de ácidos y bases blandas y duras. Como se ha comentado anteriormente una base de Lewis es un donante de electrones (generalmente son los ligandos) y un ácido de Lewis es un aceptor de electrones (ión metálico). Así, según esta teoría, los ácidos duros prefieren asociarse con las bases duras, y los ácidos blandos con las bases blandas. La Tabla 1 muestra las características principales de estas clases de ácidos y bases. Aunque existen algunos iones metálicos que se encuentran en un grupo intermedio entre los ácidos blandos y duros, como son: Fe^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} .

Existen diferentes puntos de vista sobre la naturaleza del enlace que une los diferentes iones metálicos y los ligandos, aunque se puede considerar tanto como de naturaleza iónica o covalente. Posiblemente, todos los complejos están en una situación intermedia entre estos dos extremos, aunque dependiendo del metal y del ligando el enlace se puede explicar mejor mediante la teoría del campo cristalino o la de los orbitales moleculares. Normalmente, las interacciones “duro-duro” se consideran en gran medida como electrostáticas, mientras las “blando-blando” como más covalentes, al ser los efectos de los enlaces de tipo π muy importantes.

Tabla 1. Características principales de los ácidos y las bases según la teoría de Pearson junto con algunos ejemplos.

Teoría de Pearson	Características	Elementos y grupos funcionales
<i>Ácidos duros</i>	Carga positiva elevada Polarizabilidad baja Pequeñas dimensiones	H^+ , Sc^{3+} , Cr^{3+} , Cr^{6+} , Fe^{3+} , Co^{3+} , ...
<i>Ácidos blandos</i>	Carga positiva baja Polarizabilidad alta Grandes dimensiones	Cu^+ , Ag^+ , Au^+ , Cd^{2+} , Hg_2^{2+} , Hg^{2+} , Pt^{2+} , Pb^{2+} ...
<i>Bases duras</i>	Electronegatividad alta Oxidación difícil Polarizabilidad baja	NH_3 , OH^- , O^{2-} , OR^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , Cl^- , F^- , NO_3^- , ...
<i>Bases blandas</i>	Electronegatividad baja Oxidación fácil Polarizabilidad alta	H^- , R^- , CN^- , SCN^- , PR_3 , AsR_3 , HSR , SR^- , I^- , ...

De esta manera, la teoría de Pearson explica la preferencia de los iones metálicos blandos, como Cd y Pb, por los ligandos que contienen grupos funcionales con átomos donantes, como S, Se, P y As. Las interacciones entre ellos conducen a la formación de complejos con unas constantes de formación muy elevadas [65,66]. Este concepto es muy importante ya que a la hora de buscar un ligando que sea efectivo en sistemas biológicos se necesita una estabilidad termodinámica máxima del complejo [65], con el

objetivo de que el complejo formado conserve su estado integro en competición con las especies presentes en el medio natural o biológico que se encuentren. Por otro lado, la elección de un ligando para la descontaminación de un cierto metal tiene que ser lo más selectivo posible, idealmente específico para este metal.

El grupo funcional mercapto (SH), cuyo término deriva del latín *mercurium captans* (capta el mercurio), al ser una base blanda forma enlaces covalentes con iones metálicos blandos (Cd^{2+} , Pb^{2+} , Hg^{2+} ,...). Sin embargo, también es capaz de formar enlaces de carácter iónico con metales que se encuentran en una situación intermedia como el Zn^{2+} y Cu^{2+} obteniendo unas constantes de estabilidad de un orden de magnitud similar. Este comportamiento postula los grupos R-S^- como eficaces remediadores para la descontaminación de metales tóxicos en los organismos y en el medio ambiente [66].

2.2.2. Técnicas utilizadas en los estudios de complejación

El estudio de los procesos de complejación, que incluye normalmente la determinación de las constantes de formación de complejos y de los procesos asociados a estos, es necesario para la comprensión de la eficacia y estabilidad de la coordinación del ligando con el metal. Cualquier método que pueda evaluar al menos la concentración de una especie en equilibrio además de su estequiometría en la disolución, proporcionaría la información necesaria para calcular las concentraciones de todas las especies en equilibrio. Y a partir de estos datos, se podrían determinar las constantes de estabilidad y/o estudiar los procesos de complejación [65,67].

Las técnicas potenciométricas junto con las técnicas espectroscópicas destacan entre el resto de técnicas como las más utilizadas en la determinación de la mayoría de constantes publicadas. No obstante, existen otras técnicas muy útiles para la determinación de las constantes de estabilidad y los estudios de especiación, como son las voltamperométricas; estas técnicas, por otro lado, proporcionan uno de los métodos más directos para estudiar la especiación de los metales traza, normalmente, sin necesidad de aplicar pretratamiento físico a la muestra acuosa [67].

El uso de la espectrometría de masas en los estudios de especiación, en concreto con ionización por electrospray (ESI-MS), ha permitido solventar algunos problemas relacionados con el uso de otras técnicas analíticas. Su aplicación se adapta

perfectamente a este tipo de estudios ya que es una técnica de ionización suave que permite preservar (en la mayoría de los casos) las formas químicas de los elementos. La aplicación de esta técnica analítica es muy útil en estudios de mezclas de iones metálicos y de ligandos en disolución, permitiendo de este modo la determinación de las estequiometrías de los complejos estudiados. Su uso es muy amplio y abarca estudios de química bioinorgánica, entre ellos sistemas complejantes de iones metálicos y biomoléculas, donde en estudios competitivos de ligando, se puede determinar la estabilidad del complejo a nivel semicuantitativo. No obstante, la estabilidad de los complejos puede experimentar alteraciones, pudiendo sufrir la pérdida del ligando o incluso la fragmentación de las moléculas. Por ello, para el diseño de los experimentos hay que tener en cuenta todos los parámetros que puedan afectar el estado final de las moléculas estudiadas [68].

Por otra parte, la formación o destrucción de enlaces está asociada con la emisión o absorción de calor durante el proceso. Por ello, los métodos calorimétricos son muy útiles para determinar parámetros termodinámicos y constantes de estabilidad [69] a partir del calor cedido o absorbido durante la interacción. Hay multitud de estudios de este tipo que investigan las interacciones entre proteínas, péptidos y agentes quelantes responsables de la detoxificación de metales en seres vivos.

2.3. Sistemas complejantes metal-ligando estudiados

Durante esta Tesis se han considerado diferentes sistemas metal-ligando y se ha llevado a cabo el análisis de las interacciones, el estudio de los procesos de complejación y la determinación de las estequiometrías de los complejos y de sus constantes de formación utilizando diferentes metodologías. Los diferentes sistemas estudiados se describen en el siguiente apartado.

2.3.1. Fitoquelatinas y metales pesados

En este sistema se estudió la complejación competitiva entre metales pesados y péptidos ricos en grupos tiólicos, como son las fitoquelatinas. Estas moléculas son sintetizadas por las plantas en respuesta a una incorporación o exposición a metales pesados. Este

tipo de estudios ayudará a la comprensión de los mecanismos de descontaminación de medios naturales que se llevan a cabo por técnicas como la fitorremediación.

Fitorremediación

La fitorremediación es un término general que se refiere a la utilización de plantas y árboles para descontaminar medios naturales mediante la extracción de contaminantes del suelo y del agua. Las plantas actúan como filtros biológicos que pueden estabilizar metales pesados o bien degradar componentes orgánicos. Esta metodología se usa especialmente en emplazamientos que hayan estado contaminados con metales, plaguicidas, disolventes, petróleo, hidrocarburos aromáticos policíclicos y lixiviados.

Sus características principales son: es una técnica *in situ* de limpieza pasiva; estéticamente agradable que no daña la estructura del suelo; no necesita grandes aportes de equipamiento mecánico ni de energía ya que es dependiente de la energía solar; se emplea en zonas no muy extensas, donde la contaminación no está a mucha profundidad debido a que está limitado a la longitud de las raíces; es una técnica que puede ser utilizada para un gran número de contaminantes; y los costes económicos que conlleva son bajos.

A continuación se describen las principales técnicas fitocorrectivas empleadas en la descontaminación de medios naturales [70]:

- Fitoextracción: también conocida como fitoacumulación, consiste en la absorción de contaminantes específicos a través de las raíces de las plantas y su acumulación en tallos y hojas (suele ser más efectivo para la extracción de los metales pesados que para los compuestos orgánicos). Este tipo de fitorremediación puede estar limitada por la biodisponibilidad de los contaminantes. Hay dos variantes de fitoextracción:
 - La hiperacumulación natural, cuando las plantas extraen los contaminantes del suelo de manera natural.
 - La hiperacumulación inducida, cuando al suelo se le añade algún agente complejante o quelatante que aumenta la solubilidad del metal, y de esta manera puede ser absorbido por las plantas más fácilmente.

- Rizofiltración: es una técnica para descontaminar aguas contaminadas con metales. Se basa en el uso de las raíces de las plantas las cuales están sumergidas en agua con el fin de absorber, precipitar o concentrar los contaminantes.
- Fitoestabilización: es un fenómeno donde la planta inmoviliza, mediante sorción, precipitación o complejación de contaminantes en la interfaz raíz-medio.
- Fitovolatilización: consiste en la absorción por parte de las plantas de compuestos orgánicos volátiles, o algunos metales como selenio, mercurio y arsénico del medio para la posterior evaporación o volatilización a la atmosfera desde las hojas.
- Fitodegradación: es la modificación química de los contaminantes en el interior de la planta provocada por el metabolismo de éstas, el cual degrada o inactiva las sustancias.

Fitoquelatinas

Durante la fitorremediación de suelos y aguas contaminadas con metales pesados se utilizan plantas, algas y algunos hongos que tienen la capacidad de generar una gran cantidad de fitoquelatinas (PC_n). Éstas son péptidos ricos en grupos tiol que se enlazan fuertemente con los metales pesados. Las fitoquelatinas se identificaron después de las metalotioneínas (MTs) y se comprobó que las PCs ejercen en las plantas el papel equivalente al que las MTs desarrollan en mamíferos y bacterias [71].

Las fitoquelatinas están compuestas de tres aminoácidos: ácido glutámico (Glu), cisteína (Cys) y glicina (Gly). Su estructura general es $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, donde el fragmento $\gamma\text{-Glu-Cys}$ se repite n veces (n puede llegar a 11 pero normalmente varía entre 2 y 5) hasta finalizar con un residuo de glicina (Figura 4). La manera simplificada de nombrar estos ligandos es PC_n, como por ejemplo PC₂ cuando el fragmento $\gamma\text{-Glu-Cys}$ se repite dos veces. Las PCs se sintetizan enzimáticamente en el citosol de las células a partir del glutatión (GSH) en presencia de metales pesados, los cuales activan la enzima PC-sintasa (PCS). Entre los diferentes metales y metaloides, el cadmio suele ser el mejor activador de esta enzima [72].

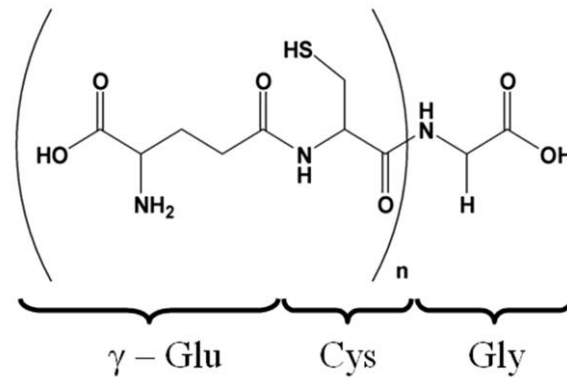


Figura 4. Estructura general de las fitoquelatinas, formada por los tres aminoácidos indicados y donde n es normalmente un valor comprendido entre 2 y 5.

Gracias al gran número de grupos sulfhidrilo, capaces de enlazarse con metales tóxicos, las fitoquelatinas pueden estabilizar dichos metales mediante la formación de complejos. Esta gran capacidad de complejar metales hace que se la considere el principal agente regulador en la homeostasis de iones metálicos. Por lo tanto, las plantas producen PC_n con el objetivo de reducir el efecto tóxico de su exposición a un exceso de metales pesados mediante la formación de complejos de gran estabilidad metal-PC_n [73].

El mecanismo de descontaminación es más complejo que una simple quelación entre el ion metálico y la fitoquelatina. La Figura 5 muestra un esquema de los mecanismos que intervienen durante la biosíntesis, complejación y almacenamiento en las vacuolas de los complejos formados. Tras la absorción de metales tóxicos, como por ejemplo iones Cd(II), tienen lugar los siguientes procesos. Primero, en el citosol, el Cd debe complejarse con una molécula de glutatión (GSH) y este complejo enlazarse a la enzima PCS (Mecanismo I), o bien el propio ion metálico se enlaza directamente a la PCS (Mecanismo II). Ambos mecanismos provocan la activación de la enzima y, entonces, se sintetizan las fitoquelatinas y se forman los complejos Cd-PC_n. Posteriormente, estos complejos, de bajo peso molecular, entran en la vacuola mediante un ATP (adenosina trifosfato) y, combinándose entre sí, dan lugar a complejos de alto peso molecular estabilizados por átomos de azufre [74,75].

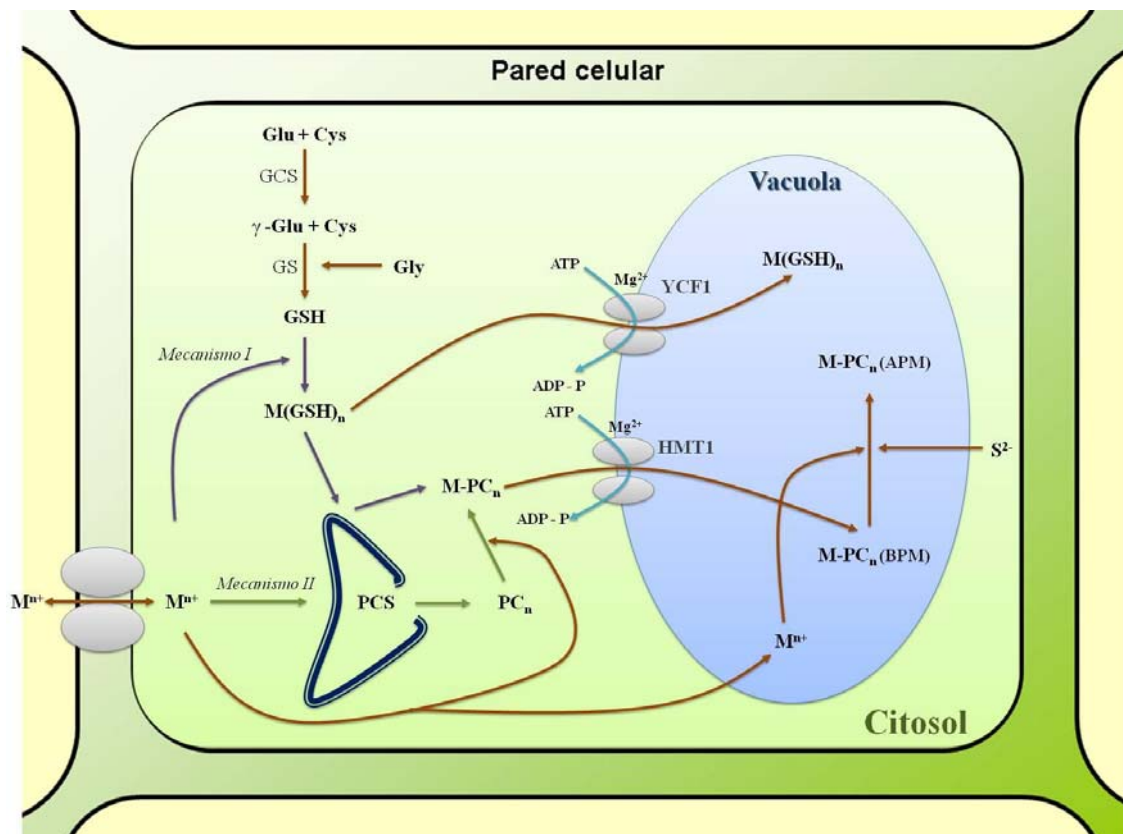


Figura 5. Representación esquemática de los mecanismos de biosíntesis de fitoquelatinas, complejación y almacenamiento. **GCS**: γ -Glutamilcisteín sintasa; **GS**: Glutación sintasa; **PCS**: Fitoquelatina sintasa; **PC_n-M BPM**: complejo metal-fitoquelatina de bajo peso molecular; **PC_n-M APM**: complejo metal-fitoquelatina de alto peso molecular, **YCF1**: Proteína vacuolar codificada por el gen Yeast Cadmium Factor; **HMT1**: Proteína vacuolar codificada por el gen Heavy Metal Tolerance.

2.3.2. Agentes quelantes y arsénico

El término quelante proviene del griego *Chele* que significa pinza de cangrejo. Este adjetivo viene asociado a la propiedad de ciertos compuestos de actuar como ligandos al tener más de un átomo donante de electrones, y formar complejos de gran estabilidad con iones metálicos en forma de anillo llamados quelatos. Los agentes quelantes se diseñaron con el fin de obtener ligandos capaces de formar complejos con los metales pesados de manera más efectiva que con los grupos fisiológicos y así anular o revertir sus efectos tóxicos, ya que estos no pueden ser metabolizados por el cuerpo humano y persisten en el organismo. Esta persistencia puede producir dolencias debido a sus efectos tóxicos cuando se combinan con ligandos endógenos esenciales para ciertas funciones fisiológicas normales.

Los agentes quelantes son sustancias usadas para el tratamiento clínico de intoxicaciones por metales pesados. Y desde el punto de vista médico, estas sustancias tienen que ser poco tóxicas, resistentes a la biotransformación, capaces de acceder a donde pueda acumularse el metal y formar complejos no tóxicos los cuales tengan constantes de estabilidad muy altas o más altas en comparación con los ligandos endógenos, además de tener altas velocidades de excreción para facilitar la eliminación del xenobiótico [76,77]. Otra característica que deberían tener los agentes quelantes es una poca o nula afinidad por el ion Ca^{2+} , dado que este ion tiene una gran disponibilidad en el plasma y podría causar hipocalcemia. De este modo, podemos definir la eficacia de los quelantes para la descontaminación de metales pesados de organismos en función de varios factores como son: i) la afinidad relativa del remediador por cierto metal pesado; ii) la distribución de éste en el organismo, comparada con la distribución del metal; iii) y su capacidad para movilizar al exterior al metal tras la quelación.

En cuanto al arsénico, este metaloide, se ha utilizado a lo largo de la historia como un agente suicida u homicida. Uno de los casos más famosos de envenenamiento es el de Napoleón donde se usó As, el cual fue detectado en sus cabellos mediante un análisis químico moderno. Frente a las diversas teorías sobre quién lo envenenó, existe la posibilidad de que fuese un envenenamiento accidental producido por el papel del tapizado de la habitación, ya que en aquella época se empleaba arsenito ácido de cobre(II) [54] como pigmento.

Este hecho histórico da idea de la alta toxicidad de este elemento. También ha sido empleado en la fabricación de armas químicas en un agente conocido como lewisita que es una sustancia arseniosa desarrollada en 1918, la cual actúa como agente vesicante e irritante pulmonar. Durante el uso de la lewisita en la segunda guerra mundial fue cuando se desarrolló el agente quelante BAL *British Anti-Lewisite* (dimercaprol, que es el 2,3dimercapto-1-propanol) como antídoto tras el envenenamiento por arsénico [78]. Los inconvenientes de esta sustancia es que es liposoluble y se oxida fácilmente haciendo que su almacenamiento sea inestable y, en consecuencia, imposibilitando la administración oral teniendo que inyectar intramuscularmente las dosis. Además, más del 50% de los pacientes sufrían efectos secundarios no graves pero si molestos.

La continua investigación sobre la desintoxicación y tratamiento contra el envenenamiento de metales tóxicos, como el arsénico, en la que se intenta conocer las

vías metabólicas de estos en el organismo y el modo de eliminación llevó a la sustitución del BAL por dos productos químicos análogos solubles en agua, el ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA) y el 2,3-dimercapto-1-propanosulfónico (DMPS), cuyas estructuras se muestran en la Figura 6.

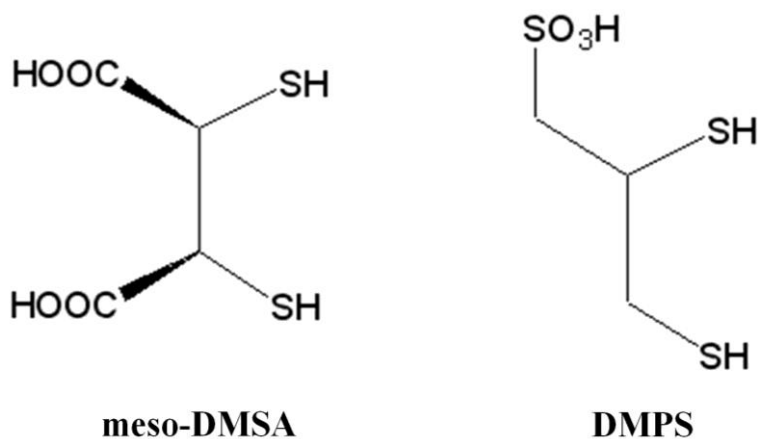


Figura 6. Estructura de los agentes quelantes meso-2,3-dimercaptosuccínico (meso-DMSA) y el 2,3-dimercapto-1- propanosulfónico (DMPS).

DMSA y DMPS

El DMSA es un agente quelante conocido como *Succimer* o *Chemet* en el campo médico, siendo de utilidad en casos de intoxicación por mercurio, arsénico y plomo. El primer informe sobre la efectividad de este agente quelante como remediador de metales pesados apareció en 1957. Se administra por vía oral absorbiéndose muy rápidamente, aunque no por completo. Durante su trayecto por el flujo sanguíneo el DMSA está enlazado fuertemente a proteínas, mayoritariamente a la albúmina, hasta que compleja los metales pesados. El inconveniente es que aproximadamente el 90% del DMSA es excretado a través de la orina al formar un puente disulfuro con la cisteína.

El DMPS es un compuesto que tiene dos grupos tiol y es soluble en agua. La síntesis y alguna propiedad sobre su complejación con metales apareció en 1956. Este fármaco se administra en el organismo oralmente o por vía intravenosa y en términos médicos es conocido como *Dimaval* o *Unithiol*. El DMPS viaja a través del flujo sanguíneo y una vez está complejado con el metal, se excreta por vía urinaria, alcanzando la máxima eliminación a las 6 horas después de la administración del fármaco.

El DMSA es un fármaco de uso permitido en pediatría para el tratamiento de intoxicaciones por plomo. En cambio, el DMPS es un quelante relativamente seguro y está homologado en Alemania para el tratamiento de la reducción de la toxicidad del mercurio aunque no se ha presentado su solicitud como nuevo fármaco en la FDA (la agencia de medicamentos y alimentos de los EEUU). Ambos se han utilizado en los tratamientos de intoxicación por Hg, Cd, Pb, As y para la enfermedad de Wilson. Estos dos fármacos, debido a su capacidad como agentes quelantes de iones metálicos, pueden reducir en el organismo los niveles de los metales tanto tóxicos como esenciales [76,77] por lo que pueden tener efectos secundarios. Existen informes que indican reacciones idiosincrásicas graves como la liberación del mercurio almacenado en el cuerpo, el cual vuelve a entrar en el torrente sanguíneo y es redistribuido a otros lugares del organismo, produciendo nuevos daños [79].

Tanto el DMPS como el DMSA han sido aplicados en organismos contaminados con arsénico. El DMSA ha tenido éxito aumentando la excreción urinaria de arsénico después de una exposición aguda, pero no tuvo éxito en la reversión de la respuesta bioquímica o histológica en una arsenicosis crónica [80]. El DMPS aumentó la excreción urinaria de arsénico en exposiciones crónicas [81], aunque aumentar la excreción del metal tóxico no significa que se produzca una mejora clínica. Sin embargo, en otro estudio con un número reducido de pacientes que se llevo a cabo con placebo se concluyó que no sólo se aumenta la excreción urinaria de arsénico, sino que también se mejoró la puntuación clínica que se utilizó para juzgar la situación de los pacientes con arsenicosis [82].

Así, aunque los estudios clínicos son limitados, parece ser que el DMPS es el mejor fármaco disponible para el aumento de la excreción del arsénico y mejorar las condiciones de los seres humanos expuestos a diversas formas de este metaloide, incluidos los expuestos crónicamente. No obstante, sigue siendo necesario realizar estudios químicos y clínicos a gran escala, ya que todavía millones de personas consumen cantidades considerables de arsénico a través del agua potable o los alimentos.

2.3.3. Bencilaminopurina y cobre

6-Bencilaminopurina, benciladenina o BAP es una molécula muy interesante debido a sus aplicaciones biológicas y medicinales.

Bencilaminopurina

El BAP es una citoquinina sintética de tipo adenina de uso común en agricultura. Su estructura se muestra en la Figura 7. Las citoquininas o citocininas constituyen un grupo de hormonas vegetales que favorecen la división y diferenciación celular. Generalmente las citoquininas se emplean en dosis muy bajas en los medios de enraizamiento porque presentan un efecto inhibitor sobre la rizogénesis [83,84].

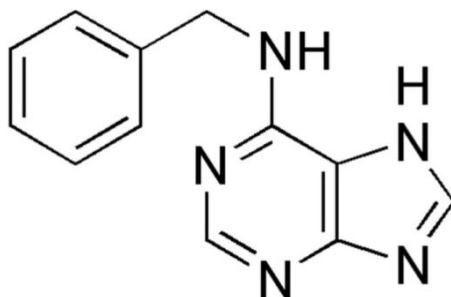


Figura 7. Estructura de la citoquinina 6-bencilaminopurina (BAP).

Entre las citoquininas el BAP es mucho más utilizado que otras sustancias como la kinetina y la zeatina, debido a que es un compuesto de gran actividad y tiene un bajo coste. Esta citoquinina también produce un aumento de la vida comercial de los vegetales verdes tras haber sido cosechados. Diferentes estudios han demostrado que el uso del BAP junto con otros compuestos, entre ellos el CaCl_2 , mejora la calidad de vegetales, como por ejemplo la de los espárragos que son muy perecederos y se deterioran rápidamente después de la cosecha, manteniendo el color verde, el contenido de vitamina C y disminuyendo la pérdida de peso. En definitiva extendiendo la vida útil tras la cosecha [85].

Igualmente, se descubrió su efecto citotóxico y se estudió su aplicación en el campo médico como anticancerígeno gracias a la capacidad del BAP y sus derivados (2-cloro-

6-bencilaminopurina, 3-cloro-6-bencilaminopurina, entre otros) de detener el progreso de células cancerosas humanas mediante la inducción de la apoptosis, es decir su muerte celular programada por ella misma [86]. En este ámbito hay estudios biológicos que muestran que el efecto antitumoral aumenta cuando el BAP o sus derivados forman complejos con ciertos metales de transición como Cu, Co, Fe, Pt y Pd. Se llevaron a cabo diversos ensayos para analizar la citotoxicidad *in vitro* frente a diversos cánceres como el melanoma humano maligno, el sarcoma osteogénico humano o el adenocarcinoma de mama humano [87]. Estos estudios indicaban que algunos de los complejos muestran un efecto citotóxico más fuerte en comparación con las formas no complejadas de la bencilaminopurina [88,89], aunque parece que este efecto citotóxico depende tanto del ion metálico como del tipo de sustituyentes en la adenina [90].

2.3.4 Otros sistemas complejantes

Durante la realización de esta Tesis se consideraron también otros sistemas de menor interés biológico, pero apreciados por la gran cantidad de información bibliográfica existente acerca de ellos, los cuales han permitido la validación de la metodología quimiométrica desarrollada. Estos sistemas son el Zn(II)/oxalato y el Cd(II)/1,10-fenantrolina.

Capítulo 3

Electrodo de Hg. Aplicación y dificultades en la interpretación de las señales

En el presente capítulo se explican las características más relevantes del electrodo de mercurio. A continuación, se explica su uso en la determinación de sustancias tóxicas y se precisan los mecanismos (procesos electroquímicos) que se producen en su aplicación a sistemas metal-ligando. También se exponen los diferentes procesos e interacciones que tienen lugar entre el electrodo de mercurio y las especies electroactivas presentes en la disolución. Posteriormente se señalan las dificultades encontradas en los datos polarográficos, las cuales producen una pérdida de linealidad de los mismos dificultando o imposibilitando un tratamiento quimiométrico mediante MCR-ALS.

3.1. Electrodo de mercurio

Durante la realización de esta Tesis se utilizó el electrodo de gotas de mercurio, en concreto se utilizó un electrodo multimodo el cual puede funcionar como electrodo de gota colgante de mercurio (HMDE), como electrodo de gotas de mercurio estacionario (SMDE) o como electrodo de gotas de mercurio clásico (DME) siendo el modo SMDE el utilizado en la presente Tesis. El electrodo multimodo que se empleó se muestra y se explica más extensamente su funcionamiento en el apartado 6.1.1.

Las principales ventajas del uso del mercurio como electrodo de trabajo son que su superficie se renueva constantemente y tiene un elevado sobrepotencial para el hidrógeno permitiendo trabajar en un intervalo de potenciales catódicos más amplio que con otros materiales.

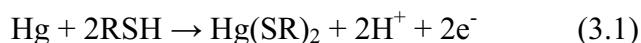
El primer electrodo de mercurio que se desarrolló consistía en un capilar de vidrio unido a un tubo de plástico con un depósito de mercurio en la parte superior. El mercurio fluye a través del capilar formando una gota minúscula y esférica en el extremo. Cuando la tensión superficial no puede soportar la gota, ésta cae formándose acto seguido una nueva gota. El depósito de mercurio se conectaba al polo negativo de una batería constituyéndose como un cátodo. Tras la conexión, la electricidad circulaba a través del mercurio provocando que en la superficie de la gota, sumergida en el seno de la disolución, se produjeran las reacciones redox de las diferentes especies químicas existentes en la disolución. El electrodo de mercurio presentaba ventajas frente a los electrodos sólidos que se solían utilizar. La renovación constante de la superficie, tras la formación de cada gota, evitaba la adsorción de impurezas sobre el electrodo, proporcionando una superficie limpia y reproducible, donde el efecto de dilución alrededor de la gota quedaba anulado ya que la caída de la gota remueve la disolución [91,92].

El electrodo se fue perfeccionando hasta 1980 que fue cuando se empezó a comercializar el electrodo de gotas de mercurio estacionario (SMDE), el cual mediante un sistema automatizado controla el flujo de mercurio. Concretamente, posee una válvula que permite la formación de gotas en menos de 100 ms con una excelente reproducibilidad y estabilidad. La principal ventaja del SMDE es que el tamaño de la gota es constante y no cambia durante la medida, hasta que la gota finalmente se

desprende por la acción de un martilleo mecánico, con lo que se obtiene un área de gota constante, eliminando así la corriente de carga adicional.

3.2. Medidas en presencia de tioles

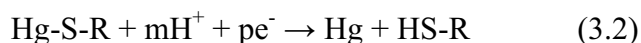
El electrodo de mercurio ha sido el material más utilizado para el análisis de compuestos tiólicos. La determinación de especies tiólicas que contienen grupos funcionales sulfhidrilo (como péptidos u otros agentes quelantes que contienen cisteína) es de gran importancia ya que sus niveles pueden indicar la presencia de diferentes enfermedades o mostrar signos de intoxicación. Entre los procesos que tienen lugar en la superficie del electrodo hay que destacar la formación y acumulación del complejo electrodo(Hg)-tiol:



Aunque la determinación de compuestos tiólicos se puede llevar a cabo oxidándolos directamente, la principal metodología utilizada es la voltamperometría de redisolución catódica (CSV) donde tras la aplicación de un potencial de deposición en el que se oxida el material del propio electrodo se aplica un barrido de potencial catódico que permite la reducción del ión metálico [93].

El mecanismo (3.1) de la formación del complejo mercurio-tiol tras la oxidación del mercurio metálico da lugar a la aparición de señales llamadas señales anódicas [94]. Como los enlaces entre el mercurio y el azufre (Hg-S) son muy estables, las sustancias tiólicas potencian la oxidación del Hg^0 y así se puede formar el enlace Hg-S.

Del mismo modo, si el potencial previo al impulso DPP (polarografía diferencial de impulsos) es suficientemente positivo como para oxidar el mercurio [95], durante ese tiempo se forman los complejos de mercurio, para después al realizar un barrido reductor dar lugar a la especie tiólica libre:



Esta señal proporciona información sobre el complejo (mercurio-péptido), la cual está directamente relacionada con la concentración de la sustancia tiólica. Esta señal analítica en forma de pico está afectada por el pH, la composición de la disolución

amortiguadora y su concentración, los cuales pueden afectar al potencial de pico, forma, reversibilidad e incluso a la propia existencia de las señales. Todo ello provoca un comportamiento poco previsible de las señales y dificultando la interpretación de las mismas.

3.3. Aplicación a estudios de complejación

La utilización de métodos voltamperométricos en estudios de complejación proporciona información directa de los iones metálicos y su especiación incluso a concentraciones de muy bajo orden de magnitud, con la ventaja de que normalmente no es necesaria la aplicación de un pretratamiento físico a la muestra acuosa. Por otro lado, estas técnicas permiten la diferenciación entre estados de oxidación debido a que las señales tienen una fuerte dependencia con la especiación del metal. Esto hace que los métodos voltamperométricos sean muy valiosos para los estudios de equilibrios de complejación porque permiten deducir las diferentes formas en que pueden existir los metales en presencia de agentes complejantes y permiten, en muchos casos, el cálculo de las constantes de complejación en sistemas metal-ligando [96].

Cuando se lleva a cabo una medida voltamperométrica, por el solo hecho de sumergir el electrodo en la disolución ya se puede diferenciar tres regiones diferentes, en donde tienen lugar procesos diferentes (Figura 8):

- El *seno de la disolución* es la zona suficientemente alejada del electrodo que no está afectada por el proceso electrodo y donde se cumplen las constantes de equilibrio entre las diferentes especies de la muestra. En esta zona sólo tienen lugar equilibrios en fase homogénea.

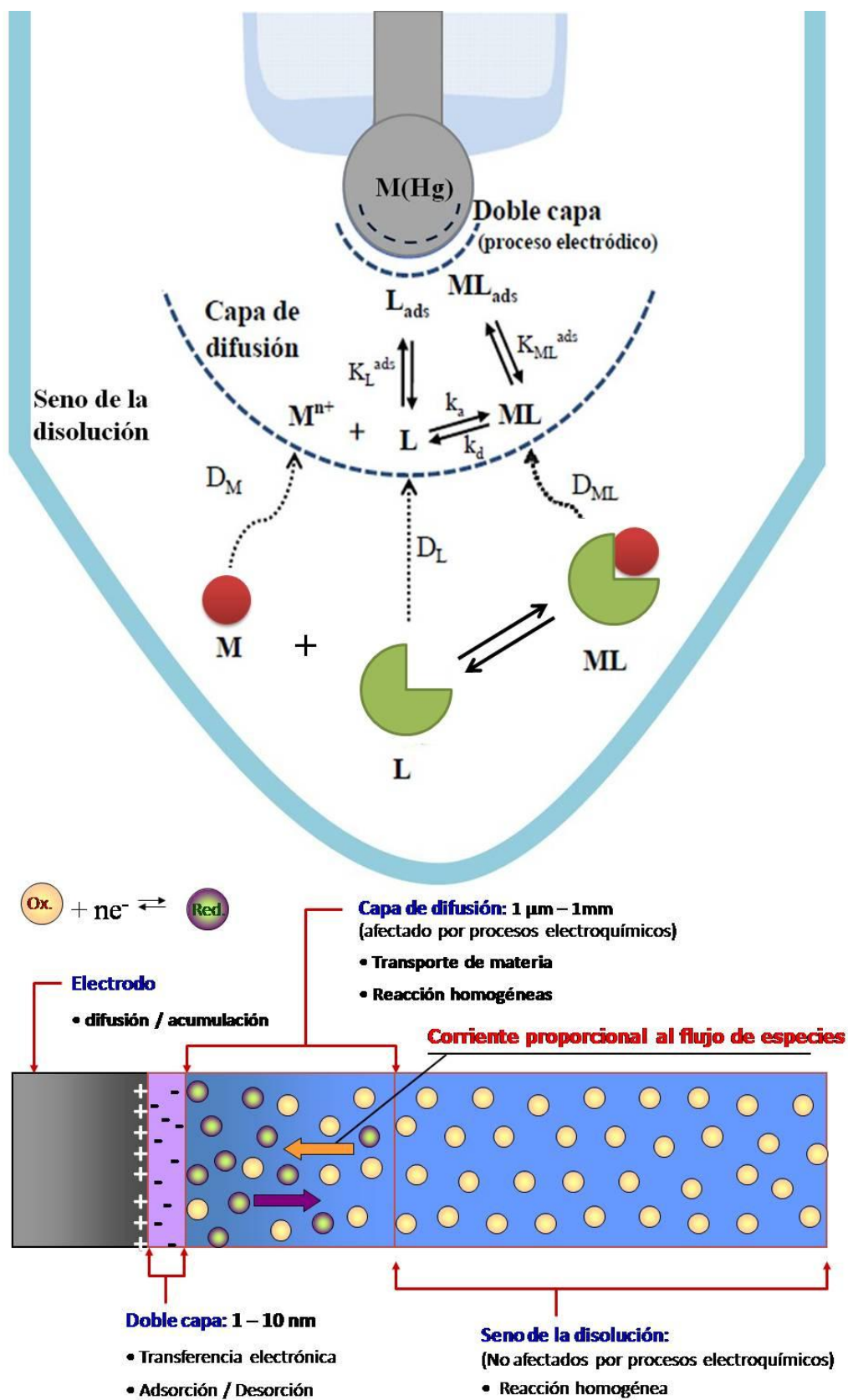


Figura 8. Procesos que tienen lugar entre un ión metálico y un ligando en cada una de las zonas de una celda electroquímica (dimensiones de las diferentes zonas no escaladas).

- La *capa de difusión* es la zona alrededor del electrodo donde el proceso electroquímico afecta a las concentraciones de las especies, provocando su difusión a diferentes velocidades desde el seno de la disolución. La variación de las diferentes concentraciones depende de la distancia al electrodo, del tiempo y del potencial aplicado como factores independientes de las especies químicas, pero también de la velocidad en que se consumen las especies electroactivas, de la velocidad de transporte hacia el electrodo y de las reacciones que pueden transformar unas especies en otras mientras se están moviendo a lo largo de la capa de difusión, lo cual está determinado por la cinética de asociación/disociación de los complejos.
- La *superficie del electrodo* es donde se producen las reacciones de oxidación o reducción, procesos de adsorción, desorción y donde aparece la carga de la doble capa.

Como ya se ha comentado anteriormente, las señales electroquímicas tienen una dependencia muy alta con la especiación del metal. Y en el caso particular de los sistemas de complejación metal-ligando, donde el ligando es una sustancia tiólica, tras un barrido catódico por DPP se obtienen señales relacionadas con los procesos electroquímicos mostrados en la Figura 9 donde se puede ver los procesos de reducción de los iones metálicos unidos o no al ligando y los procesos relacionados con las señales anódicas del mercurio.

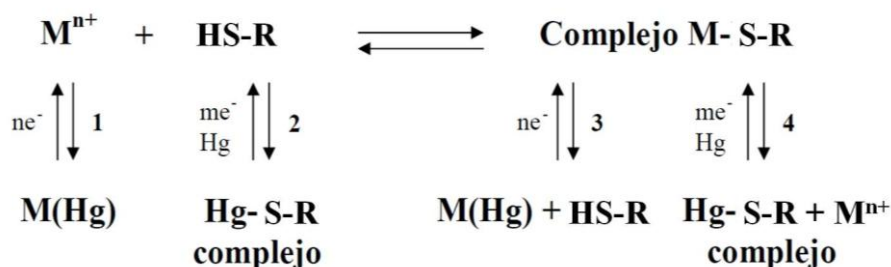


Figura 9. Esquema de los posibles procesos electroquímicos que tendrían lugar al aplicar un barrido catódico a un electrodo de mercurio sumergido en una disolución de un ión metálico en presencia de ligandos tiólicos. 1. Reducción del ión metálico libre; 2. Señal anódica de la especie tiólica libre (HS-R); 3. Señal de reducción de los complejos (M-S-R); 4. Señal anódica de los complejos (M-S-R).

La complejidad de los polarogramas puede ser elevada ya que no solo se obtienen las señales del metal libre y de sus complejos sino que coexisten una serie de señales relacionadas con procesos anódicos entre el ligando y sus complejos con el mercurio del electrodo [94]. A menudo, la interpretación de estos sistemas se complica debido a que junto a la propia complejación coexisten otros procesos como son la difusión de las especies, la adsorción electródica o complicaciones de tipo cinético.

3.4. Dificultades en la interpretación de las señales

Tras la obtención de los voltamperogramas de estos sistemas metal-ligando queda la parte crucial de la interpretación de estos con el fin de resolver de forma satisfactoria el comportamiento de los sistemas. Como hemos explicado en el apartado anterior, las señales voltamperométricas pueden presentar una gran complejidad debido a las interacciones y procesos que determinan su aparición y evolución. Todo ello, junto con el solapamiento que puede haber de señales hace necesaria, en muchas ocasiones, la utilización de herramientas y metodologías quimiométricas como el MCR-ALS [4,97]. Aunque para la aplicación de metodologías de MCR hay que asumir plenamente la condición de linealidad entre señal y concentración.

3.4.1. Solapamiento de señales

El tratamiento quimiométrico a datos electroanalíticos apareció inicialmente para solventar la resolución de señales solapadas. Esta separación se puede hacer mediante el filtro de Kalman o la transformada de Fourier [98]; ambas metodologías tratan las señales individualmente, voltamperograma a voltamperograma. No obstante, el aumento de la complejidad de las señales ha hecho imprescindible la utilización de otros tratamientos quimiométricos más potentes y versátiles como el MCR-ALS.

3.4.2. Complejo lábil e inerte

La relación entre la ventana de tiempo que la técnica utiliza en la medida y la cinética de asociación-disociación produce un fenómeno que, desde el punto de vista electroquímico, permite la diferenciación entre complejos lábiles y complejos inertes.

Los complejos lábiles son aquellos cuya cinética de asociación-disociación es mucho más rápida que la velocidad de la medida del instrumento por la técnica en cuestión; esto significa que hay una interconversión continua de especies, lo que implica un total cumplimiento de las constantes de estabilidad en la capa de difusión. Como consecuencia, se obtendrá una única señal que corresponde a un promedio de la reducción de todas las especies metálicas existentes. En cambio, se le otorga el tratamiento de electroquímicamente inerte a los complejos cuya cinética de asociación-disociación es más lenta que el tiempo necesario para efectuar la medida y, por lo tanto, al no tener lugar la interconversión de las especies en la capa de difusión, cada especie se transporta de manera independientemente para ser finalmente reducida en el electrodo, obteniéndose señales independientes.

Sin embargo, este fenómeno no suele estar tan bien definido ya que muchos sistemas metal-ligando presentan una cinética de asociación-disociación del mismo orden que la ventana de tiempo de la técnica. Este comportamiento intermedio entre complejos lábiles e inertes supone una dificultad añadida a la correcta interpretación de los datos experimentales.

3.4.3. Pérdida de linealidad

Cuando los componentes, procesos electroquímicos en el caso de las medidas voltamperométricas, contribuyen independientemente a la corriente medida en una magnitud proporcional a su concentración se dice que los datos son lineales o bilineales. Sin embargo, en las medidas electroquímicas frecuentemente se observa la falta de linealidad entre señales y concentración en el seno de la disolución. Este comportamiento es mucho más habitual en los datos electroquímicos que los espectroscópicos. Esto se debe, como se ha mencionado antes, a que diversos fenómenos físico-químicos y cinéticos que se dan en la capa de difusión, aparte de la reacción de transferencia de electrones, influyen directamente en la intensidad medida

en la superficie del electrodo. Estos comportamientos muchas veces comprometen la linealidad de los datos.

En las valoraciones complexométricas de metales con ligandos tiólicos seguidas mediante DPP, la causa más frecuente de pérdida de linealidad es la formación de complejos electroquímicamente lábiles, pues la continua interconversión de especies durante la medida provoca un progresivo desplazamiento lateral de las señales conforme aumenta la fracción complejada respecto al metal libre. No obstante, la desviación de la linealidad de los datos causada por el desplazamiento lateral de las señales también puede ocurrir debido a cambios en la reversibilidad electroquímica de los procesos que producen las señales [97].

Por otra parte, la pérdida de linealidad de los datos experimentales se produce por la presencia de las señales anódicas relacionadas con los procesos anódicos del mercurio con el ligando libre y los complejos formados, ya que éstas presentan frecuentemente desplazamientos del potencial de pico, aumento o disminución de la anchura de pico o de la intensidad de la señal y, muy a menudo, un solapamiento importante con las señales de interés. Hay que señalar también que, además de los fenómenos mencionados, existen otros como la adsorción de ligandos o complejos sobre la superficie del electrodo que pueden provocar corrientes capacitivas y, como consecuencia, importantes derivas de las diferentes señales o bien distorsiones de la línea base.

Todas estas dificultades se han de tener en consideración en el momento de elegir la metodología quimiométrica apropiada para el análisis posterior de los datos, ya que, aunque métodos como MCR-ALS son capaces de resolver sistemas muy complejos donde existe un gran solapamiento de señales, estos métodos se basan en la premisa de una respuesta bilineal de los datos para una factorización de la matriz experimental (**I**) en una matriz de voltamperogramas puros (\mathbf{V}^T) y una matriz de concentraciones (**C**). Pero, tal como se ha indicado, la falta de linealidad de los datos electroquímicos es habitual, y la aplicación de MCR-ALS no siempre es posible a no ser que la desviación de la linealidad sea pequeña [41]; en estos casos aunque existe una mayor falta de ajuste se puede llegar a resultados químicamente válidos [96].

Parte II.

Metodologías aplicadas

Capítulo 4

Técnicas instrumentales

En este Capítulo se incluye una breve descripción de las técnicas instrumentales empleadas en la presente Tesis Doctoral. En el primer apartado se explican las diferentes técnicas voltamperométricas utilizadas (polarografía de impulsos diferencial, voltamperometría cíclica y voltamperometría de impulsos de gran amplitud). En los apartados posteriores se detallan las técnicas que se han utilizado para complementar la información obtenida mediante las técnicas voltamperométricas, como la espectrometría de masas por ionización de electrospray, la calorimetría de valoración isotérmica (ITC) y la espectrofotometría ultravioleta visible (UV-vis). La información incluida en este capítulo está relacionada con la parte de resultados y discusión de la memoria.

4.1. Técnicas voltamperométricas

La voltamperometría comprende un grupo de técnicas electroquímicas que se basan en el estudio de las curvas de intensidad-potencial. Tras la aplicación de una señal de excitación (función de potencial) a una celda electroquímica que contiene la disolución de electrolito en estudio, se genera una respuesta en forma de intensidad de corriente que depende de los analitos y que es función de los potenciales redox de las especies electroactivas, de sus concentraciones y de la velocidad de transferencia de materia en la doble capa, además de otros parámetros menos influyentes [86,99]. Los electrodos de trabajo utilizados pueden ser muy diversos (tanto en material como en geometría). Cuando se utiliza un electrodo de gotas de mercurio la voltamperometría recibe el nombre de polarografía.

Las técnicas voltamperométricas tienen su origen en el año 1922 cuando el químico checo Jaroslav Heyrovský desarrolló la polarografía clásica utilizando un electrodo de gotas de mercurio [100]. Este descubrimiento hizo que en 1959 recibiera el Premio Nobel de Química. La polarografía clásica es una técnica voltamperométrica basada en el barrido lineal de potencial desde un valor en el que no hay proceso electródico hasta un potencial final en donde la intensidad alcanza un valor constante y en donde el control del proceso se realiza únicamente por el transporte de materia. Esta técnica fue utilizada para el análisis de cationes de metales y un gran número de sustancias orgánicas. Sin embargo, la polarografía clásica tiene baja sensibilidad debido a que presenta una relación señal/ruido poco favorable, consecuencia de una importante contribución de las corrientes capacitivas.

Para mejorar la sensibilidad de la técnica se actuó sobre las corrientes capacitivas y para ello se desarrollaron modificaciones que implicaban variaciones en las señales de potencial aplicado y en el diseño de los electrodos de trabajo. Así, la superposición de impulsos de potencial a la rampa lineal de potencial produce una intensidad de corriente cuya componente capacitiva se minimiza mucho respecto a la intensidad farádica de interés. Por otro lado, la utilización de electrodos de gotas de mercurio estacionario (SMDE) en vez de electrodos de gotas de mercurio (DME) también contribuyó a la mejora. Sirviéndose de este concepto teórico, se han desarrollado diferentes modalidades de técnicas voltamperométricas como son la voltamperometría cíclica

(CV), la voltamperometría diferencial de impulsos (DPV), la de onda cuadrada (SWV), la de impulsos normal (NPV) y la de corriente alterna (ACV) [92,101,102].

La mejora de las prestaciones, así como una alta sensibilidad, selectividad, robustez, precisión y un amplio intervalo de linealidad, junto con el bajo coste de la instrumentación, la portabilidad y la creciente utilización de nuevos electrodos [102] han producido un resurgimiento del interés por los métodos voltamperométricos para la determinación cualitativa, cuantitativa y cribado de una gran variedad de compuestos - en particular en el campo farmacéutico, ambiental y biológico-, así como para la caracterización de procesos redox en diferentes medios, para el estudio de los mecanismos de transferencia de electrones y en estudios de especiación metálica.

Las medidas voltamperométricas se llevan a cabo en celdas electroquímicas que contienen un sistema de tres electrodos:

- Electrodo de trabajo: el proceso electroquímico se produce en la superficie del electrodo de trabajo. Ha de ser fácilmente polarizable y su superficie pequeña para asegurar una alta densidad de corriente.
- Electrodo de referencia: el potencial de este electrodo ha de ser conocido y estable a temperatura constante. Su función es actuar como referencia para medir el potencial del electrodo de trabajo. A menudo, estos electrodos están aislados de la disolución de muestra por medio de un puente intermedio, con el fin de prevenir la contaminación de la disolución. Normalmente se utiliza como electrodo de referencia el electrodo de plata - cloruro de plata (Ag/AgCl).
- Electrodo auxiliar: se utiliza para transferir la corriente al electrodo de trabajo. La superficie es mucho más grande que la de éste, con el fin de asegurar que el proceso electroquímico ocurra lo suficientemente rápido y así no limitar el proceso en el electrodo de trabajo. El electrodo auxiliar es de un material inerte como el platino o el grafito.

El funcionamiento básico de las técnicas voltamperométricas es la aplicación de una señal de potencial entre el electrodo de trabajo y el de referencia y la medida de la intensidad que fluye entre los electrodos de trabajo y auxiliar.

4.1.1. Polarografía diferencial de impulsos

Para la realización de los trabajos presentados en esta Tesis se ha utilizado principalmente la polarografía diferencial de impulsos (DPP). Esta técnica fue la escogida para el estudio electroquímico de los sistemas de complejación metal/ligando, ya que permite llegar a concentraciones cercanas a las del medio celular ($\leq 10^{-5}$ mol L⁻¹ en ligando) y ofrece una fuerte dependencia de sus señales con la especiación de los compuestos estudiados.

DPP es un tipo de voltamperometría diferencial de impulsos donde el electrodo de trabajo es un electrodo de gotas de mercurio estáticas (Static Mercury Drop Electrode, SMDE). Es una técnica muy útil para la determinación de trazas tanto de especies orgánicas como inorgánicas y que permite el seguimiento tanto de procesos de reducción como de oxidación. Las características del electrodo de mercurio se detallan en el Capítulo 3.

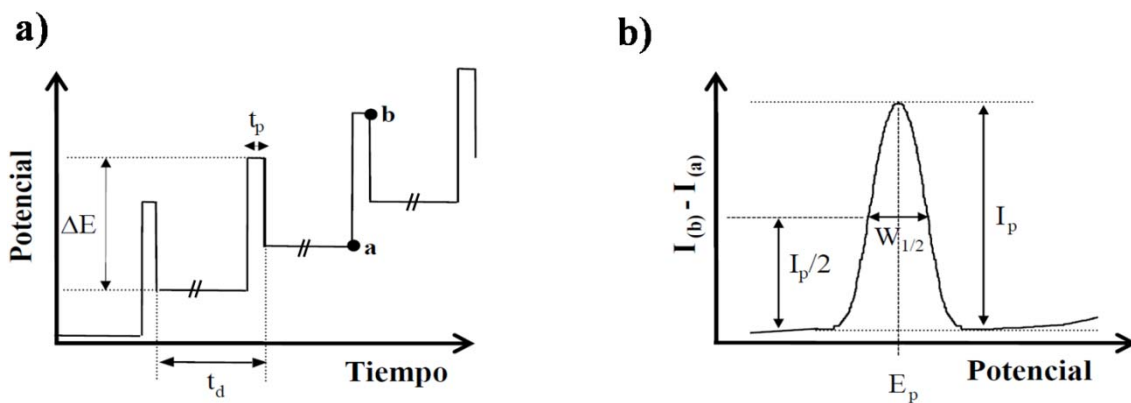


Figura 10. a) Señal de excitación de la voltamperometría diferencial de impulsos. b) Voltamperograma de respuesta analítica típica.

La señal de excitación aplicada en un barrido de DPP (Figura 10a) es una rampa lineal de potencial a la cual se han superpuesto impulsos de potencial de amplitud constante ($\Delta E = 20-100$ mV), a intervalos de tiempo también constantes ($t_d = 1-2$ s); la duración de estos impulsos (t_p) suele estar entre los 50 y 100 ms y se aplican al final de vida de la gota.

La medida de la intensidad de corriente corresponde a la diferencia entre la medida de intensidad justo antes de aplicar cada impulso de potencial (I_a) y justo antes de que éste finalice (I_b), representado de esta manera $I_b - I_a$ frente al potencial, lo que da un voltamperograma en forma de pico (Figura 10b). Esta señal analítica es simétrica cuando el proceso es reversible y tiene una altura (I_p) directamente proporcional a la concentración del analito en el seno de la disolución, que además aumenta al incrementar la amplitud del impulso. La anchura a media altura ($W_{1/2}$) del pico depende del impulso aplicado. La medida de la diferencia de intensidades a potenciales tan próximos mejora considerablemente la relación señal-ruido y minimiza las intensidades capacitivas lo que hace que la polarografía diferencial de impulsos pueda llegar a determinar, en condiciones muy favorables, concentraciones del orden de 10^{-7} mol L⁻¹. Hay que señalar que tanto la DPP como la DPV (con electrodos estacionarios) ofrecen una mayor selectividad frente a otras técnicas de impulsos, pues la señal analítica en forma de pico mejora la resolución entre especies [101,102].

4.1.2. Voltamperometría cíclica

La voltamperometría cíclica es una técnica electroanalítica en donde se aplica un barrido de potencial en forma triangular a un electrodo estacionario (Figura 11a) entre dos potenciales E_1 y E_2 y se mantiene la disolución sin agitación. El intervalo de potenciales seleccionado en cada experimento es aquel en el que tiene lugar la oxidación o la reducción controlada por difusión de uno o más analitos. La velocidad de barrido es la misma en ambas direcciones y dependiendo si la dirección inicial es hacia potenciales positivos o negativos se denominan barrido anódico o catódico, respectivamente [101,102]. La corriente medida se registra en función del potencial aplicado y se obtienen voltamperogramas como el que se muestra en la Figura 11b.

En los voltamperogramas cíclicos los parámetros característicos son el potencial y la intensidad tanto del pico catódico (E_{pc} y I_{pc}) como del anódico (E_{pa} y I_{pa}). La reversibilidad de la reacción electródica implica corrientes de pico anódico y catódico aproximadamente iguales pero de signo opuesto (excepto para el caso de iones metálicos y electrodos de mercurio) y con una diferencia entre los potenciales anódico y catódico de $0,0592/n$ V (siendo n el número de electrones implicados en la semireacción). La voltamperometría cíclica es una técnica que se utiliza básicamente

para el estudio de mecanismos y de cinéticas de los procesos redox tanto de sistemas orgánicos como organometálicos o inorgánicos.

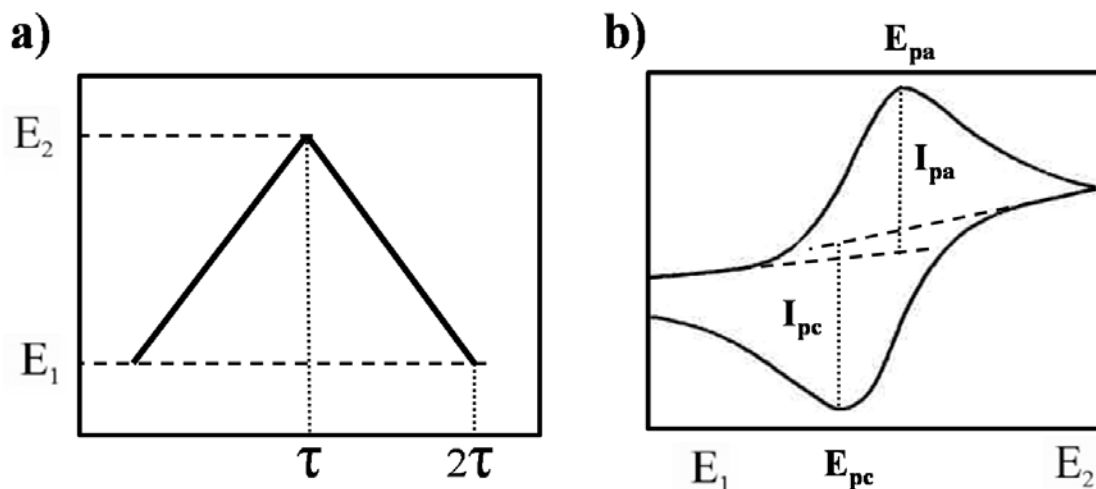


Figura 11. a) Barrido de potencial durante una medida de voltamperometría cíclica; donde E_1 es el valor inicial, E_1 y E_2 son los dos valores límite. b) Voltamperograma cíclico típico de una reacción reversible, donde E_p e I_p son el potencial de pico y la intensidad de corriente respectivamente.

4.1.3. Voltamperometría de impulsos de gran amplitud

La voltamperometría de impulsos de gran amplitud (Large Amplitude Pulse Voltammetry, LAPV) es una técnica que se basa en la medida de la variación de la intensidad de corriente frente al tiempo en que dura la aplicación de una serie de impulsos de amplitud elevada. La función de potencial aplicada consta de impulsos de potencial cuya amplitud aumenta o disminuye tal como se muestra en la Figura 12a.

La intensidad de corriente medida al aplicar los impulsos tiene una evolución exponencial, la cual viene determinada por la contribución de la corriente no farádica (debida a la reorganización de las cargas en la doble capa eléctrica) y de la corriente farádica (correspondiente a las reacciones de oxidación/reducción que ocurren en el electrodo), tal como se muestra en la Figura 12b. Ambas corrientes tienen una relación directa con la naturaleza del electrodo, el analito y la concentración de éste presente en la disolución permitiendo obtener información sobre la composición química de la muestra. La señal medida tendrá sólo la componente no farádica si la amplitud de

potencial aplicado no es suficiente para que se produzcan reacciones electroquímicas, en cambio si los compuestos se oxidan o reducen la señal del impulso será una combinación de corriente no farádica y corriente farádica. Al inicio de cada medida se aplica un potencial de 0 V omitiendo así la corriente farádica y posteriormente se aplican los sucesivos impulsos de diferente amplitud.

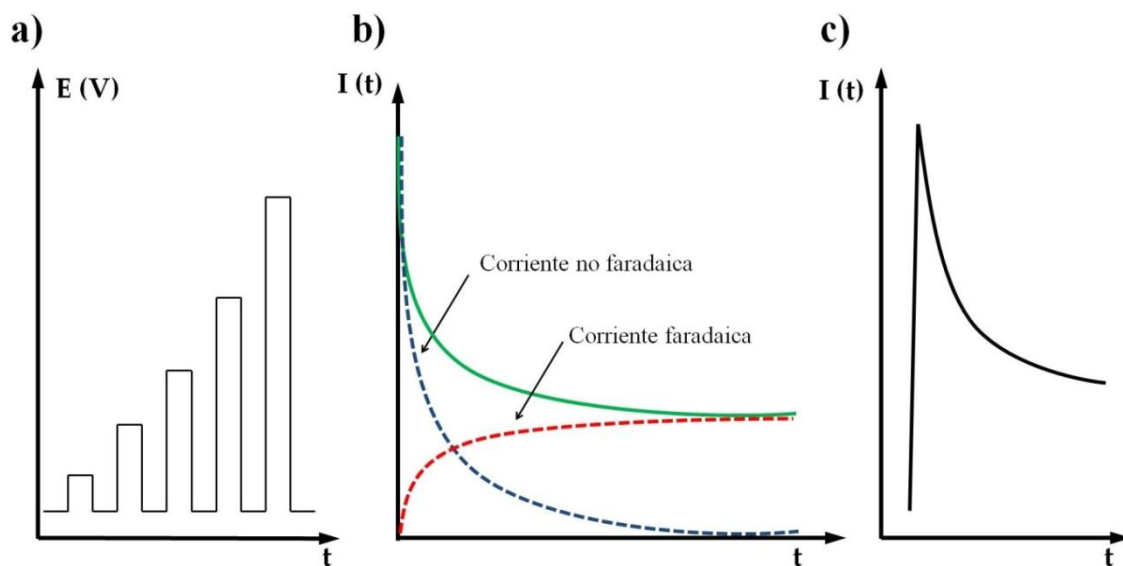


Figura 12. a) Señales típicas de potenciales de LAPV aplicados frente al tiempo. b) Respuesta de la variación de corriente tras un impulso y las contribuciones que la componen. c) Señal analítica típica de la aplicación de un de impulso de gran amplitud LAPV.

Inicialmente la señal de intensidad para cada impulso de la LAPV es puntiaguda debido a la migración de las especies cargadas hacia la superficie del electrodo creando así la doble capa de Helmholtz. A continuación, la señal decae hasta que la corriente está limitada por la corriente farádica de difusión, como se muestra en la Figura 12c. El tamaño y la forma de la respuesta transitoria reflejan la cantidad y los coeficientes de difusión de las especies electroactivas y sus cargas en la disolución [103]. Esta técnica poco usual se utiliza básicamente cuando se trabaja con narices y lenguas electrónicas voltamperométricas.

4.2. Espectrometría de masas

La espectrometría de masas (MS) es una técnica imprescindible en química analítica, utilizándose para el análisis de moléculas inorgánicas, orgánicas y biológicas, para la determinación de la composición elemental y de bajos niveles de concentración de analitos en muestras, para determinar la estructura y la composición de superficies, para determinar relaciones isotópicas, o para establecer la composición cualitativa o cuantitativa de muestras complejas. El campo de aplicación de esta técnica es muy grande abarcando la investigación biotecnológica, farmacéutica, clínica y medioambiental.

Las tres partes fundamentales en las que se puede dividir un espectrómetro de masas son: i) la *fente de ionización* es donde se introducen las muestras ya sea de manera directa o indirecta, a través de un cromatógrafo o un equipo de electroforesis capilar y en donde las moléculas son ionizadas; ii) el *analizador* en el cual entra un haz de iones positivos o negativos procedentes de la fuente de ionización y en donde las especies se separan en relación de su masa/carga (m/z); iii) el *detector* a donde llegan los iones separados, el cual envía las señales a un sistema de adquisición de datos donde los resultados referentes a las distintas relaciones m/z se recogen y se presentan en forma de un espectro de masas [104].

Los métodos de ionización que se utilizan dependen de la naturaleza de la muestra y la clase de información que se desea obtener. Los espectros de masas obtenidos dependen en gran medida del sistema de ionización utilizado siendo por este motivo una etapa crucial para el análisis de cualquier muestra por MS. Los métodos de ionización que se pueden utilizar son: ionización química a presión atmosférica (APCI), ionización química (CI), ionización por impacto de electrones (EI), ionización por electrospray (ESI), bombardeo con átomos acelerados (FAB), ionización y desorción de campo (FD/FI), ionización por desorción láser (LDI), ionización por desorción láser asistida por una matriz (MALDI) o ionización de termospray (TSP).

Los diversos analizadores tienen diferentes principios físicos para separar y medir las masas de los iones. La elección entre estos varía en función de sus aplicaciones y las necesidades del estudio, ya sea la exactitud de las masas que es capaz de separar, acceso a los iones de masas moleculares muy altas, una máxima resolución o una gran sensibilidad. Dentro de los diferentes tipos de analizadores, los más utilizados son los de

sector magnético, de cuadrupolo (Q), de trampa de iones (IT), de tiempo de vuelo (TOF), de resonancia iónica en ciclotrón (ICR) o analizadores Orbitrap. En algunas ocasiones los analizadores no ofrecen las expectativas analíticas deseadas para muestras complejas. En estos casos se recurre al acoplamiento de dos analizadores con la finalidad de conseguir los resultados requeridos.

Actualmente, existen en el mercado una gran variedad de sistemas de ionización y de analizadores y en consecuencia hay una gran diversidad de instrumentos disponibles, aunque no todos los métodos de ionización son compatibles con todos los analizadores. En los análisis bioquímicos la mayoría de los estudios se realizan mediante los métodos de ionización ESI o MALDI. En los trabajos de complejación de esta Tesis se ha utilizado un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y un analizador de tiempo de vuelo (ESI-TOF), el funcionamiento del cual se describe a continuación.

Durante los años 80 del siglo pasado aparecieron diversos trabajos en donde se utilizaba el método de ionización mediante electrospray, aunque fue en los años 90 cuando se produjo el auge en su aplicación. El desarrollo de ESI dio lugar a que John B. Fenn recibiera el premio Nobel en Química en 2002 «for the development of soft desorption ionisation methods for mass spectrometric analyses of biological macromolecules (electrospray)».

Durante la ionización por electrospray la muestra se disuelve en un disolvente polar y volátil, y se bombea por un capilar de acero inoxidable de 75–150 μm a una velocidad de flujo entre 1 $\mu\text{L min}^{-1}$ y 1 mL min^{-1} . En la punta del capilar se aplica una gran tensión negativa o positiva entre ± 3 y ± 4 kV. Debido al voltaje aplicado la muestra se dispersa en forma de aerosol donde las gotas están cargadas. Para ayudar a propagar el espray por el espectrómetro de masas un gas nebulizador (nitrógeno) circula a lo largo de la parte externa del capilar [104,105,106]. El esquema está representado en la Figura 13a. Una corriente de nitrógeno caliente que pasa frente a la fuente de ionización evapora el disolvente de las gotas cargadas disminuyendo de esta manera su tamaño. Esta evaporación hace que aumente la densidad de la carga eléctrica en la superficie de las gotas hasta un punto crítico. En este momento, las gotas se dividen en gotas más pequeñas. La repulsión electrostática expulsa los iones a partir de las diminutas gotas altamente cargadas en la fase de gas, como se observa en la Figura 13b. Finalmente, algunos de estos iones pasan por el cono que se encuentra en una zona intermedia al

vacio para acabar pasando a través de una pequeña apertura al analizador del espectrómetro de masas.

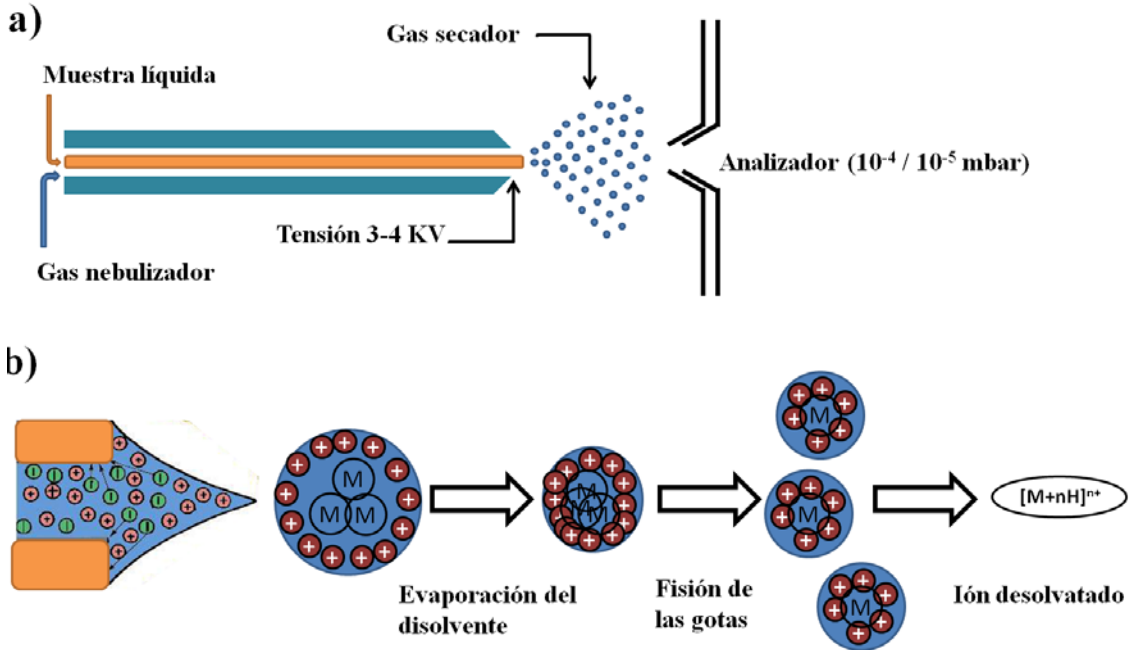


Figura 13. a) Esquema de la fuente de ionización por electrospray. b) Proceso de ionización por electrospray

La composición de las disoluciones amortiguadoras que se utilizan en los análisis ESI es clave para obtener una buena sensibilidad en las medidas, debido a que la tensión superficial es crucial para la formación de un spray estable. Es necesario también optimizar otros parámetros como la velocidad de flujo, el voltaje aplicado y la conductividad. Además, las disoluciones compatibles con ESI han de ser volátiles y la composición del disolvente dependerá del tipo de análisis y del modo de electrospray que se elija. En el caso de péptidos y proteínas el modo positivo es habitualmente el más utilizado para los análisis. En el modo positivo las cargas se transportan por los clúster del disolvente a través de los ácidos débiles utilizados, como el fórmico o acético los cuales inducen la protonación de las moléculas. La mayoría de estos casos se llevan a cabo con las disoluciones protonadas de acetonitrilo/agua o metanol/agua [106].

ESI es una técnica analítica muy sensible que se considera como un método “suave” de ionización ya que se transfiere muy poca energía a la molécula a parte de la requerida

para producir la ionización de las muestras mediante la desprotonación o protonación. Por este motivo queda muy poca energía extra que pueda provocar la disociación o la fragmentación de los iones de la muestra. Después de la etapa de ionización los iones pasan al analizador.

El analizador de tiempo de vuelo (Time Of Flight, TOF) fue el utilizado en los trabajos de la presente Tesis. Éste es uno de los analizadores más sencillos y se basa en la relación entre la masa y la velocidad de los iones. Se mide el tiempo que necesitan los iones acelerados para recorrer una distancia determinada (L), la cual depende de las características del instrumento, sin que los iones estén sometidos a un campo eléctrico y/o magnético. Los iones formados se aceleran mediante impulsos de campo eléctrico de 10^3 - 10^4 V. Los iones acelerados pasan a la región donde no hay campo externo, que se llama *drift tube* (tubo de flujo) [104]. Como todos los iones tienen la misma energía cinética, sus velocidades (v) están directamente relacionadas con su masa (m) como se puede observar en la ecuación:

$$v = \sqrt{\frac{2zV}{m}} \quad (\text{Ec. 4.1})$$

donde z y V son la carga y el potencial aplicado, respectivamente. Por lo tanto, los iones más ligeros llegarán al detector antes que los más pesados. Al substituir la velocidad (v) por la longitud del tubo de flujo (L) entre el tiempo (t) se obtiene la ecuación expresada en tiempo de vuelo:

$$t = L \sqrt{\frac{m}{2zV}} \quad (\text{Ec. 4.2})$$

Las prestaciones del TOF son especialmente interesantes, sobre todo en cuanto a la resolución y la exactitud en la determinación de la masa ya que se consiguen valores inferiores a partes por millón.

4.3. Valoración calorimétrica isotérmica

Para el análisis termodinámico de muchos sistemas se utilizan técnicas calorimétricas. Estas técnicas describen el estado y la transformación de las especies, proporcionando la explicación de por qué y hacia donde evolucionan los sistemas físico-químicos. Estas

características otorgan a estas técnicas una gran utilidad para el estudio de interacciones químicas y/o biológicas.

Entre las técnicas calorimétricas, las valoraciones calorimétricas isotérmicas (ITC) se utilizan para caracterizar termodinámicamente los fenómenos de interacción entre diversas especies. Esto implica la determinación de la energía libre de Gibbs (ΔG), la entalpía (ΔH) y la entropía (ΔS) a una temperatura determinada, y también la capacidad calorífica, la cual se utiliza para predecir el cambio de los tres parámetros mencionados anteriormente [107]. Además, a través de la medida directa de la variación de calor que se produce durante la formación de un complejo a temperatura constante, se puede calcular la constante de asociación y la estequiometría del complejo formado. En su origen, esta técnica se utilizó para la cuantificación de las interacciones en sistemas bioquímicos, aunque debido a la gran sensibilidad que presenta su uso se ha ido extendiendo a diferentes campos del análisis químico y del reconocimiento molecular, siendo ampliamente utilizada en estudios de bioquímica, física, biotecnología, biomedicina y farmacología.

La ITC consiste en la adición de alícuotas de una disolución que contiene uno de los componentes (ligando o metal, en nuestro caso) en una celda aislada a temperatura constante que contiene la disolución del otro componente. El principio fundamental es que es un sistema cerrado a temperatura y presión definidas, el equilibrio químico corresponde al mínimo de la energía libre de Gibbs (ΔG). El proceso de complejación se sigue respecto a una celda de referencia que contiene el mismo disolvente que el usado en la celda de trabajo. A partir de los datos experimentales se determina directamente, mediante un ajuste no lineal por mínimos cuadrados, la constante de formación (K_a), la estequiometría (N) y la entalpía (ΔH), así como la energía libre de Gibbs (ΔG) y la entropía (ΔS) a través de las ecuaciones siguientes [69,107]:

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Ec. 4.3})$$

$$\Delta G = -RT \ln K \quad (\text{Ec. 4.4})$$

Cuando se produce una reacción exotérmica (cesión de calor) durante las adiciones, esta provoca cambios negativos de la potencia en el sistema y con el fin de mantener el equilibrio de las temperaturas entre las dos celdas (celda de trabajo y referencia) el sistema debe proporcionar la potencia necesaria para compensar la diferencia térmica.

En este caso se observan picos negativos en el gráfico que representa las señales de potencia en función de la relación metal/ligando o viceversa. Estas señales irán disminuyendo a lo largo de las adiciones hasta observar solamente el calor de la dilución. En cambio, cuando en la celda de trabajo se producen reacciones endotérmicas, los picos que se observan son positivos [108]. Los datos típicos obtenidos en un experimento de ITC se presentan en la Figura 14a donde se puede ver que las señales, en forma de pico, son debidas al calor producido en la reacción tras las sucesivas adiciones de ligando en la celda calorimétrica de trabajo la cual contiene una disolución de metal. Estos datos se integran con respecto al tiempo y se normalizan en función de la relación molar como se muestra en la Figura 14b.

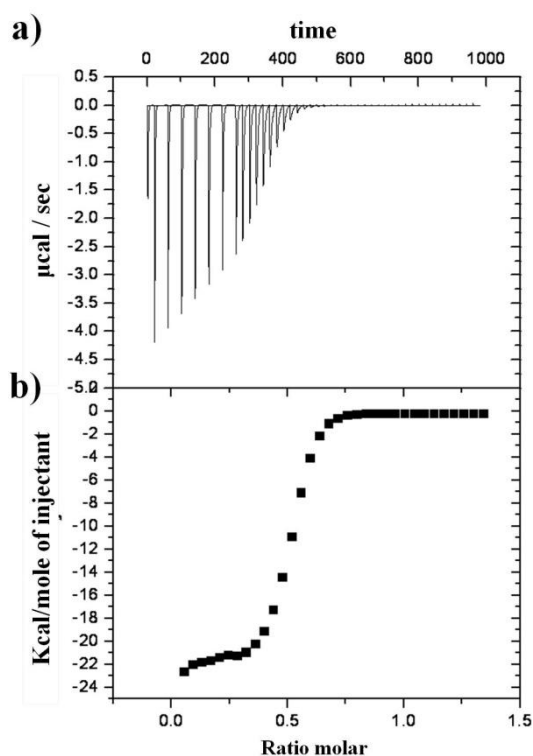


Figura 14. a) Datos experimentales de una valoración calorimétrica isotérmica. b) Gráfica con los datos integrados respecto a la relación molar.

4.4. Absorción molecular ultravioleta visible

La técnica de absorción molecular en el ultravioleta y en el visible (UV-vis) es una técnica espectroscópica que se basa en la irradiación de las muestras con radiación

electromagnética de esta zona del espectro y absorción de parte de esta radiación por las moléculas en estudio.

Durante la irradiación de energía a una molécula si la diferencia entre dos estados electrónicos coincide con la energía de los fotones ($h\nu$) de la radiación incidente ésta se absorberá y se producirá una transición entre dos estados, de manera que un electrón en estado fundamental (baja energía) pasará a un estado excitado (alta energía). La relación logarítmica entre la intensidad de la radiación emitida (I_0) que llega a la celda y la intensidad de salida (I), una vez ha atravesado la disolución con la muestra, se define como absorbancia (A) y se relaciona con la concentración según la ley de Lambert-Beer, donde ϵ es la absorptividad molar, b el camino óptico y c la concentración:

$$A = \log_{10} \left(\frac{I_0}{I} \right) = \epsilon bc \quad (\text{Ec. 4.5})$$

Las longitudes de onda pertenecientes a la región UV van desde 200 a 400 nm y para la visible de 400 a 800 nm. La absorción de radiación UV-vis para cualquier sustancia se debe a transiciones electrónicas de la capa de valencia dentro de estos intervalos. Las transiciones electrónicas $\pi \rightarrow \pi^*$ y $n \rightarrow \pi^*$ son las principales responsables de las bandas de absorción UV-vis y pueden tener lugar entre orbitales cromóforos o entre uno cromóforo a otro que no lo sea [109].

Capítulo 5

Tratamiento de datos

A pesar de que esta Tesis se basa en el desarrollo y aplicación de una nueva metodología quimiométrica para el tratamiento de datos voltamperométricos, también se trataron los datos del sistema entre el BAP y el cobre por MCR-ALS, con el objetivo de hacer un análisis combinado de datos de diferentes técnicas instrumentales proporcionando una mejor diferenciación entre los componentes, la existencia de zonas más selectivas, la aplicación de un número mayor de restricciones y, en consecuencia, una mayor calidad en la extracción de información.

También se utilizó la voltamperometría de eliminación mediante barrido lineal (EVLS) para estudiar los procesos de adsorción de un ligando y sus complejos en el electrodo durante las medidas.

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

La metodología MCR-ALS ya ha sido previamente explicada en apartado 1.2. La aplicación del MCR-ALS a valoraciones complexométricas consta de las siguientes etapas (Figura 15):

i) Una vez *registrados los voltamperogramas o espectros* a diferentes ratios metal/ligando, los datos se transfieren al entorno de Matlab, mediante el programa *gpes* el cual estructura los datos experimentales en un vector de potenciales o longitudes de onda y una matriz de intensidades. Posteriormente, se *combinan* ambos en una matriz por filas.

ii) A continuación, se *suavizan* los datos y se *corrige la línea base* tal y como se explicó en el apartado 1.1.1. Las matrices de intensidades suavizadas generalmente ofrecen una falta de ajuste menor cuando se descomponen durante el proceso iterativo. Sin embargo, en ocasiones, esta corrección puede dificultar la diferenciación de componentes si sus vectores respuesta unitarios son excesivamente similares.

iii) Para la *estimación del número de componentes* necesarios para explicar la variabilidad de la matriz \mathbf{I} , es necesario descomponer ésta en valores singulares mediante el algoritmo Singular Value Decomposition (SVD) el cual descompone la matriz \mathbf{I} en una matriz diagonal cuyos elementos, no negativos y presentados en orden decreciente, son sus valores singulares [110]. La estimación se efectúa visualmente, de manera que si no existe pérdida de linealidad de los datos electroquímicos, deriva de la línea base u otras interferencias de tipo físico como adsorción electródica, los valores singulares más significativos se pueden asociar a especies químicas diferentes o a procesos electroquímicos diferentes.

iv) Un paso importante para ayudar al proceso de optimización es la selección de una *estimación inicial de la matriz C* o \mathbf{V}^T . En medidas voltamperométricas, la construcción de la matriz \mathbf{V}_0^T inicial es lo más recomendable y se lleva a cabo mediante el programa *peakmaker* [111] desarrollado por el grupo de Electroanálisis. Este programa permite dibujar en la pantalla del ordenador, para cada uno de los componentes escogidos, un voltamperograma teórico que sigue

funciones de tipo gaussiano. En cambio, en las medidas espectroscópicas la estimación inicial se realiza mediante el método *simple-to-use interactive self-modeling analysis* (SIMPLISMA) que analiza matemáticamente los datos de la matriz **I** para retornar las columnas con los componentes o variables más puras o las filas con los espectros más puros [112].

v) Se introducen una serie de restricciones (explicadas en el apartado 1.2) asociadas a unas propiedades químicas o matemáticas que se cumplen en todo el sistema o algunos de sus componentes.

vi) Y finalmente se *factoriza* la matriz experimental **I**.

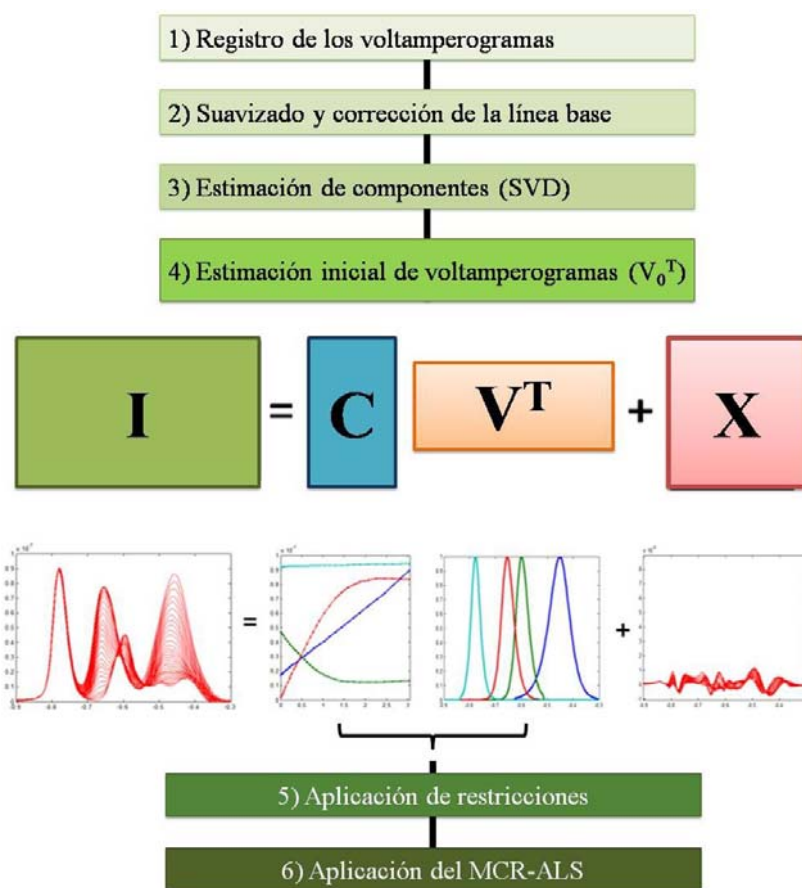


Figura 15. Etapas del tratamiento quimiométrico por MCR-ALS a datos voltamperométricos.

Para aplicar el MCR-ALS a un estudio combinado de matrices obtenidas por diferentes técnicas instrumentales se han de diseñar los experimentos de manera adecuada, haciendo que las matrices experimentales **I** de ambas técnicas contengan el mismo

número de columnas (potenciales, longitudes de onda) y/o de filas (voltamperogramas, espectros) a fin de poder formar una matriz I_A denominada matriz aumentada (Figura 16).

$$\begin{array}{c} n_1E \quad n_2E \\ \boxed{I_1 \quad I_2} \\ nr \end{array} = \begin{array}{c} nS \\ \boxed{C} \\ nr \end{array} * \begin{array}{c} n_1E \quad n_2E \\ \boxed{V_1^T \quad V_2^T} \\ nS \end{array} + \begin{array}{c} n_1E \quad n_2E \\ \boxed{X_1 \quad X_2} \\ nr \end{array}$$

Figura 16. Organizaciones matriciales para el análisis MCR-ALS simultáneo de valoraciones obtenidas por diferentes técnicas instrumentales para un mismo sistema.

En el caso de las valoraciones complexométricas, para la construcción de la matriz aumentada con matrices experimentales de diferentes técnicas instrumentales, el número y el progreso de las medidas de la valoración para ambas matrices experimentales I_1 e I_2 han de ser el mismo. De esta manera, la variabilidad en las concentraciones se mantiene al aumentar las filas de la matriz, por lo que obtendremos unos perfiles de concentraciones C únicos para ambas valoraciones y una matriz V^T que contendrá los voltamperogramas/espectros unitarios diferenciados según las técnicas utilizadas.

5.2. Voltamperometría de eliminación con barrido lineal (EVLS)

La voltamperometría de eliminación con barrido lineal (Elimination Voltammetry with Linear Scan, EVLS) es un método voltamperométrico que mediante un tratamiento matemático de los voltamperogramas permite la eliminación de ciertas intensidades de corrientes de las medidas que se llevan a cabo por voltamperometría de barrido lineal (LSV). El método se basa en la eliminación de una o más intensidades superfluas, mediante combinaciones lineales adecuadas de resultados experimentales.

EVLS se aplica con el fin de separar el efecto que produce la intensidad de difusión, cinética y de carga en la intensidad de corriente total. La teoría se fundamenta en que parte de la intensidad de la corriente total (I) se puede expresar como suma de las intensidades de corrientes particulares (I_j) [113]:

$$I = \sum I_j \quad (\text{Ec. 5.1})$$

y donde cada intensidad de corriente particular se expresa como una combinación de dos funciones independientes:

$$I = W(v) \cdot Y_j(E) = Y_j(E) \cdot v^x \quad (\text{Ec. 5.2})$$

siendo las funciones $Y(E)$ específicas para cada intensidad de corriente mientras que las funciones $W(v)$ dependen de las velocidades de barrido (v):

$$(1) \text{ Intensidad de difusión} \quad I_d = v^{\frac{1}{2}} \cdot Y_d(E) \quad (\text{Ec. 5.3})$$

$$(2) \text{ Intensidad cinética} \quad I_k = v^0 \cdot Y_k(E) \quad (\text{Ec. 5.4})$$

$$(3) \text{ Intensidad de carga} \quad I_c = v \cdot Y_c(E) \quad (\text{Ec. 5.5})$$

$$f(I) = \sum_{i=1}^n a_i \cdot I_i \quad (\text{Ec. 5.6})$$

Donde I_i es el total de corrientes voltamperométricas medidas a una velocidad de barrido determinada (i) y a_i es el coeficiente de eliminación [114]. Mediante combinaciones lineales de las intensidades parciales, medidas a diferentes velocidades de barrido (intensidad de difusión I_d , intensidad cinética I_k e intensidad de carga I_c), se obtienen seis funciones de eliminación de manera que algunas intensidades pueden ser conservadas y otras eliminadas. La corriente puede ser descrita por una función general con tres términos:

$$a_i I_i = a_i(I_d)_i + a_i(I_k)_i + a_i(I_c)_i \quad (\text{Ec. 5.7})$$

Según las intensidades que se conserven o eliminen se obtienen las diferentes funciones de eliminación que se muestran en la Tabla 2, donde a_1 , a_2 y a_3 son coeficientes de eliminación calculados mientras que I_1 , I_2 y I_3 son las corrientes totales medidas a velocidades de barrido distintas, pudiendo trabajar a cualquier velocidad siempre y que se cumpla que $v_1 < v_2$ y $v_2 < v_3$. En el caso particular de que el proceso medido por EVLS esté controlado por difusión, es en la función E4 donde se conserva la intensidad de difusión y se eliminan las de intensidad cinética y carga.

Tabla 2. Tipos de funciones de eliminación donde I_d , I_k , I_c son la intensidad de difusión, la intensidad cinética y la intensidad de carga respectivamente.

Funciones EVLS	Características	Ecuación f(I)
E1	$I_d \neq 0; I_k = 0; (I_c \text{ distorsionada})$	$a_1 \cdot I_1 + a_2 \cdot I_2$
E2	$I_d \neq 0; I_c = 0; (I_k \text{ distorsionada})$	
E3	$I_d = 0; I_k \neq 0; (I_c \text{ distorsionada})$	
E4	$I_d \neq 0; I_k = 0; I_c = 0$	$a_1 \cdot I_1 + a_2 \cdot I_2 + a_3 \cdot I_3$
E5	$I_d = 0; I_k \neq 0; I_c = 0$	
E6	$I_d = 0; I_k = 0; I_c \neq 0$	

El procedimiento experimental en la aplicación de EVLS es el siguiente:

- i. Se registran una serie de voltamperogramas cíclicos a diferentes velocidades de barrido (v_1 , v_2 y v_3).
- ii. Después se exportan los datos a Excel.
- iii. Se calculan los coeficientes de eliminación con Matlab y se exportan a Excel.
- iv. Finalmente, se multiplican a las corrientes totales y se suman siguiendo la función E4, obteniendo un único vector.

De este modo, se puede distinguir si las especies transportadas se absorben o no en el electrodo antes de su reducción. En el caso de la adsorción, se obtiene una señal de forma de pico-contrapico característico para la función de intensidad $f(I_d)$.

Esta técnica se ha considerado en esta Tesis para el estudio de las interacciones del sistema BAP:Cu(II) con el objetivo de obtener información más detallada de los procesos que se producen en la superficie del electrodo.

Parte III.

Sección experimental

Capítulo 6

Instrumentación y reactivos

En este capítulo se presenta la instrumentación utilizada para el desarrollo de esta Tesis. En primer lugar se detalla la instrumentación electroanalítica, para a continuación describir el espectrómetro de masas, el microcalorímetro y el espectrofotómetro ultravioleta-visible que se han utilizado para complementar los resultados obtenidos a partir del tratamiento quimiométrico de los datos voltamperométricos.

En el apartado de reactivos se incluyen tanto los reactivos utilizados para los estudios de las interacciones metal–ligando como los utilizados en los estudios realizados durante la estancia predoctoral en la Universidad de Linköping. Igualmente se describe la preparación de las diferentes disoluciones utilizadas a lo largo de la Tesis.

6.1. Instrumentación

6.1.1. Instrumentación electroquímica

Instrumentación polarográfica

Los diferentes estudios polarográficos se han realizado con el equipo 757 VA Computrace (Metrohm) conectado a un ordenador personal mediante el software de adquisición de datos VA Computrace 1.0. El electrodo de trabajo utilizado es un electrodo multimodo que combina el de gotas de mercurio (DME/SMDE) y el de gota colgante de mercurio (HMDE) en un único dispositivo (Figura 17a).

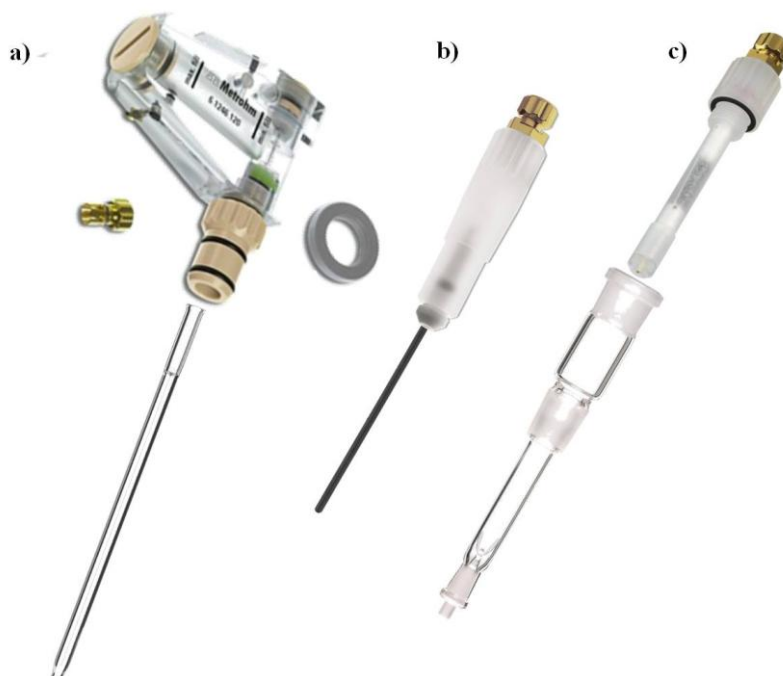


Figura 17. Electrodo utilizado en la celda voltamperométrica: a) Electrodo de trabajo multimodo de gotas de mercurio; b) Electrodo auxiliar de carbono vitrificado; c) Electrodo de referencia de Ag|AgCl y puente salino para el electrolito.

Éste consiste en un módulo que encierra un depósito que contiene el mercurio el cual fluye por un capilar de vidrio (longitud 12-20 cm, diámetro interno 30-50 μm) formándose una gota en el extremo del capilar. La formación de la gota está controlada por un mecanismo neumático. El depósito de mercurio tiene una conexión eléctrica para poder realizar las medidas. En la presente Tesis el electrodo se utilizó en modo de gotas

de mercurio estáticas (SMDE). De esta manera tenemos una gota de superficie constante prácticamente durante toda su vida, lo que minimiza la contribución de la intensidad capacitiva. La pureza del mercurio debe ser elevada y se utiliza siempre mercurio bidestilado.

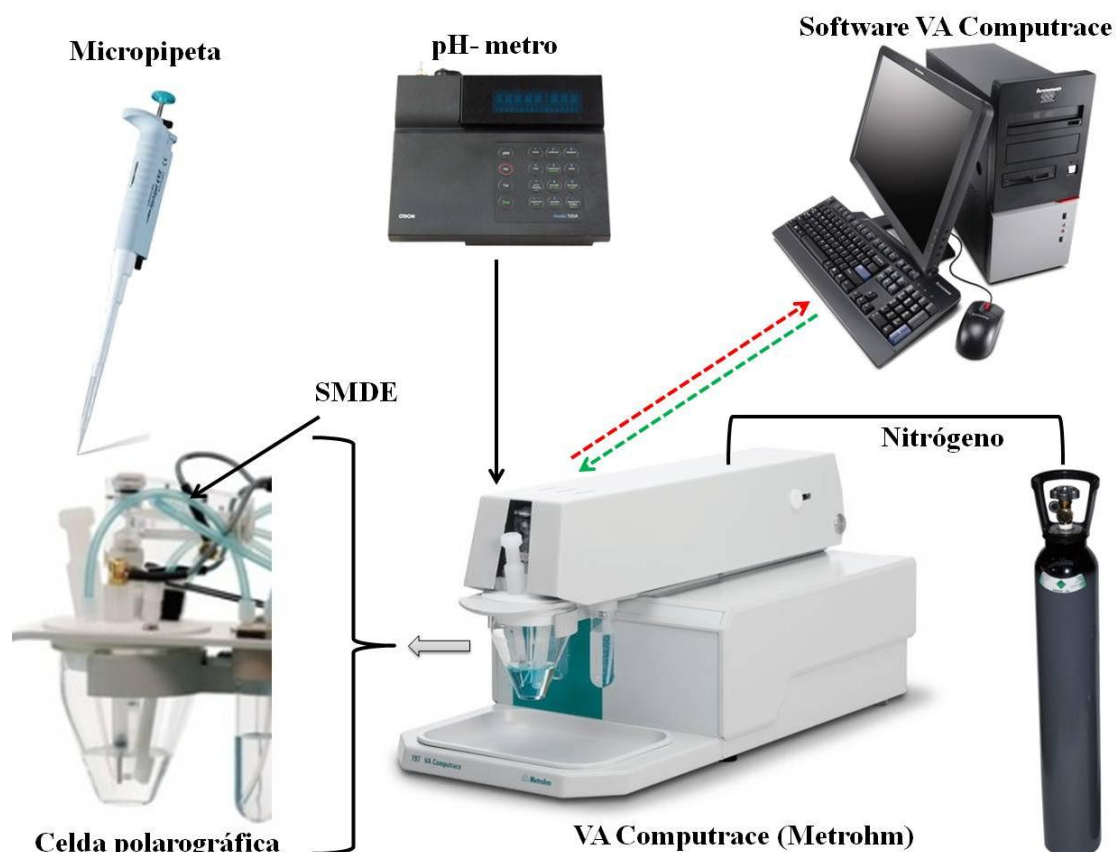


Figura 18. Esquema del montaje instrumental utilizado en las valoraciones polarográficas.

La celda electroquímica donde se llevaron a cabo los diferentes análisis electroquímicos, además del electrodo de trabajo contiene un electrodo auxiliar de carbono vitrificado y un electrodo de referencia de $\text{Ag}|\text{AgCl}|3 \text{ mol L}^{-1} \text{ KCl}$ elegido ya que tiene valores de potencial muy reproducibles (Figura 17b y Figura 17c, respectivamente).

El montaje experimental consiste en una celda electroquímica constituida por los tres electrodos conectados al potenciostato y sumergidos en la disolución de trabajo que

contendrá las especies que se analizan. La celda incorpora también una entrada de nitrógeno para poder pasar el gas a través de la disolución antes de iniciar la valoración y justo después de cada adición, con el fin de desoxigenar la muestra y así evitar la aparición de las señales del oxígeno y la oxidación de los compuestos estudiados. Las adiciones de los diferentes compuestos se realizaron con micropipetas automáticas Nichipet EX (Nichiryo). El pH de las disoluciones se mide con un electrodo combinado Orion 9103SC conectado con un pH-metro Orion SA 720. La Figura 18 muestra el esquema instrumental utilizado.

Instrumentación voltamperométrica utilizada en la Universidad de Linköping

Los estudios mediante LAPV se llevaron a cabo con un sensor voltamperométrico de platino, el cual tiene incorporado un sistema de autopulido. El sensor voltamperométrico consta de un anillo de platino (que actúa como electrodo de trabajo) que se encuentra alojado dentro de un cilindro de acero inoxidable, utilizado como electrodo auxiliar. Para estos estudios se omitió el uso de un electrodo de referencia (Figura 19a). El Pt fue seleccionado como material para el electrodo de trabajo debido a sus propiedades catalíticas. El mecanismo de autopulido consiste en dos piezas de vidrio afiladas que están presionando sobre la superficie del electrodo de trabajo y el borde del cilindro de acero inoxidable. Todo ello está conectado a través de un eje a un motor eléctrico (9 V), del cual se optimizó su funcionamiento a una velocidad de una vuelta cada 10 s.

El sensor de Pt y el electrodo auxiliar están conectados a una unidad electrónica, construida en el laboratorio de Applied Physics de la Universidad de Linköping, la cual consiste en un potencióstato y una tarjeta de adquisición de datos, todo ello junto con los parámetros experimentales se controlan a través de un programa específico creado en LabVIEW. En la Figura 19b se muestra el esquema del montaje experimental.

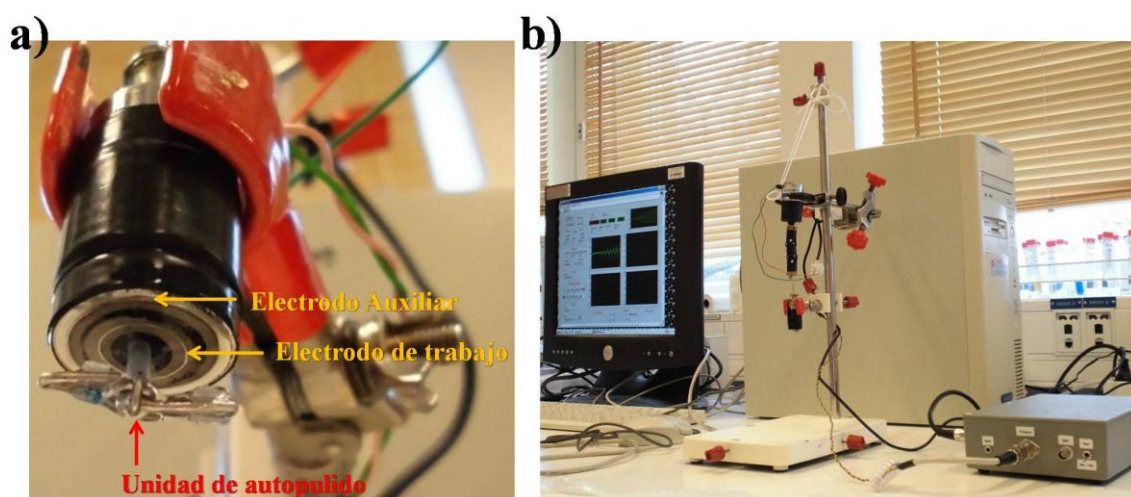


Figura 19. a) Sensor voltamperométrico con unidad de autopulido utilizado. b) Montaje instrumental utilizado en las medidas mediante el sensor voltamperométrico.

6.1.2. Instrumentación de espectrometría de masas

Las medidas de espectrometría de masas se han realizado para la determinación de las masas de los complejos en los sistemas metal/ligando estudiados. Estas se llevaron a cabo en un espectrómetro de masas con ionización por electrospray y un detector de tiempo de vuelo (Agilent 6500 series). Las muestras se introducían directamente a través de un inyector. En la Figura 20 se puede ver el instrumento utilizado. El control instrumental, la deconvolución de los espectros y su análisis se han realizado a través de un ordenador mediante el programa MassHunter Workstation Software (B.02.00). Estas medidas se han llevado a cabo en los laboratorios de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).



Figura 20. Espectrómetro de masas series ESI-TOF (Agilent 6500 series).

6.1.3. Instrumentación calorimétrica

Las valoraciones calorimétricas se han llevado a cabo en el microcalorímetro VP-ITC MicroCal (MicroCal, Inc.), pudiendo medir el calor absorbido o emitido durante el estudio de la interacción metal/ligando. En la Figura 21 se muestra el microcalorímetro utilizado y una representación esquemática de éste. El instrumento consiste en dos celdas, una de trabajo donde tiene lugar la reacción entre el metal y el ligando, y otra que hace de referencia y que contiene el mismo medio (disolvente, disolución amortiguadora de pH) que la de trabajo. Ambas celdas están fabricadas de Ni Hastelloy® Alloy C 276. El acceso a las celdas, ya sea para llenarlas o limpiarlas, está situado en la parte superior del instrumento donde se sitúa la jeringa inyectora (el volumen del inyector es de 0,3 mL) la cual se utiliza también para la agitación de la disolución. El volumen de trabajo de las celdas es de 1,4 mL, aunque el volumen total (contando la celda en forma de moneda y el tubo de acceso a ella) es de 1,8 mL. Todos los parámetros experimentales y el funcionamiento del inyector se controlan a través del software VPViewer (MicroCal, Inc.). Estas medidas se han llevado a cabo en los laboratorios de los Centros Científicos y Tecnológicos de la Universidad de Barcelona (CCiTUB).

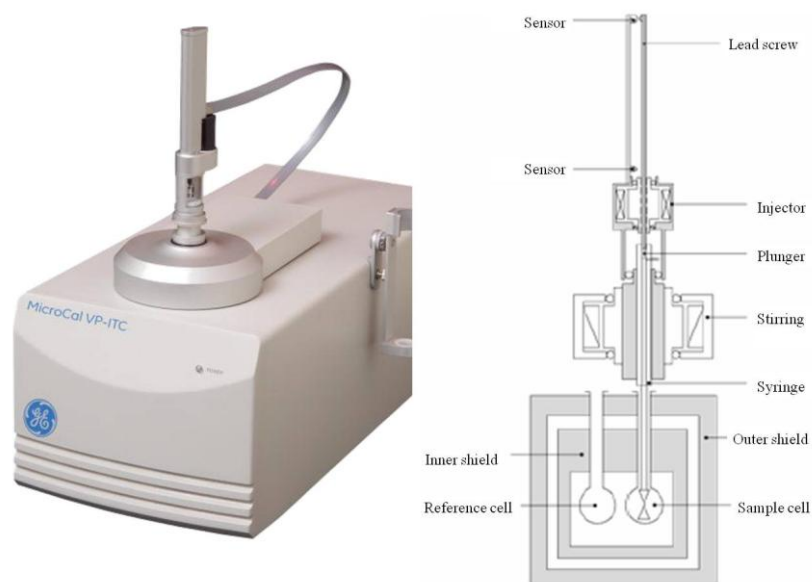


Figura 21. Microcalorímetro VP-ITC y la representación esquemática de sus componentes.

6.1.4. Instrumentación espectrofotométrica de UV-vis

Para el estudio de absorción molecular ultravioleta visible (UV-vis) se utilizó un espectrofotómetro Lambda 19 (Perkin-Elmer) mostrado en la Figura 22. Es un instrumento de doble haz, de manera que en la primera cubeta se coloca la disolución amortiguadora de pH que actúa de blanco y en la segunda cubeta se sigue la valoración entre el metal y el ligando.

Las cubetas utilizadas son de cuarzo (Suprasil) con un paso de luz de 10 mm. Todos los parámetros experimentales son controlados y los datos son adquiridos a través de un ordenador personal.



Figura 22. Fotografía del espectrofotómetro Perkin-Elmer Lambda 19.

6.2. Reactivos y disoluciones

6.2.1. Reactivos

Todos los reactivos utilizados fueron adquiridos en las empresas Merck, Sigma-Aldrich, Panreac, Fluka o Carlo Erba y son de grado analítico o suprapuro (Tabla 3).

Las fitoquelatinas (γ -Glu-Cys)₂-Gly (PC2) y (γ -Glu-Cys)₅-Gly (PC5) han sido sintetizadas por la empresa DiverDrugs, S.L. (Barcelona). La pureza cromatográfica de las fitoquelatinas sintetizadas es superior al 90 %. Las impurezas son fragmentos

minoritarios de PCn, sin los grupos reducidos, y tienen un impacto mínimo sobre los procesos de complejación de estos sistemas. El ácido meso-2,3-dimercaptosuccínico (DMSA), el 2,3-dimercaptopropanosulfato de sodio (DMPS) y la bencilaminopurina (BAP) se han obtenido en Sigma-Aldrich. El captopril (1-[(2S)-2-Methyl-3-sulfanylpropanoyl]-L-proline) procede de Fluka.

Tabla 3. Reactivos de las disoluciones auxiliares utilizadas.

<i>Nombre</i>	<i>Estructura</i>	<i>Proveedor</i>
Nitrato de cadmio	$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Nitrato de zinc	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Merck
Nitrato de plomo	$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$	Merck
Nitrato de cobre (II)	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	Merck
Óxido de arsénico (III)	As_2O_3	Merck
Nitrato de potasio	KNO_3	Fluka
Perclorato de sodio	$\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Panreac
Ácido nítrico	HNO_3	Merck
Ácido clorhídrico	HCl	Merck
Hidróxido de potasio	KOH	Merck
Hidróxido de sodio	NaOH	Merck
Oxalato de potasio	$\text{K}_2\text{C}_2\text{O}_4$	Carlo Erba
Acetonitrilo	CH_3CN	Merck
Etanol absoluto	EtOH	Panreac

Tabla 4. Reactivos utilizados durante la estancia en la Universidad de Linköping.

<i>Nombre</i>	<i>Estructura</i>	<i>Proveedor</i>
Extracto de carne		Merck
Digerido pancreático de Caseína		Merck
Urea	CH ₄ N ₂ O	Fluka
Cloruro de sodio	NaCl	Merck
Cloruro de calcio	CaCl ₂	Merck
Sulfato de magnesio	MgSO ₄	Merck
Bicarbonato de sodio	NaHCO ₃	Merck
Hidrógeno fosfato de potasio	K ₂ HPO ₄	Merck

Los reactivos utilizados en los estudios realizados durante la estancia en la Universidad de Linköping se muestran en la Tabla 4. Las disoluciones de aguas residuales sintéticas se llevaron a cabo disolviendo en 1L de agua filtrada y esterilizada todos los compuestos de la Tabla 4 [115]. Las muestras de leche y de crema de leche con diferente contenido graso (Arla, Suecia) se adquirieron en un comercio local.

6.2.2. Preparación de las disoluciones

Todas las disoluciones se preparan utilizando agua ultrapura Milli-Q 185 (Millipore) a excepción de la disolución patrón de BAP que se disolvió en etanol. Todas las valoraciones se han llevado a cabo usando disoluciones amortiguadoras de pH de concentración entre 0,1-0,02 mol L⁻¹, y en las medidas electroanalíticas se adiciona además como electrolito soporte KNO₃ o NaClO₄ a una concentración entre 0,05 y 0,1 mol L⁻¹. El valor de pH se ajusta utilizando disoluciones de ácido o de base. En la Tabla 5 se indican todos los reactivos utilizados para la preparación de las disoluciones amortiguadoras de pH.

Las medidas de espectrometría de masas (ESI-MS) se han llevado a cabo en una disolución amortiguadora de acetato de amonio/amoniaco $0,02 \text{ mol L}^{-1}$ a pH de 5,1, 6,5 o 7,4 dependiendo del sistema estudiado. Las fases móviles utilizadas han sido disoluciones 1:9 acetonitrilo (HPLC grade):acetato de amonio (5 mM) a pH 5,1, 6,5 o 7,4.

Tabla 5. Reactivos de las disoluciones amortiguadoras de pH utilizadas.

<i>Nombre</i>	<i>Estructura</i>	<i>Proveedor</i>
Bis(2-hidroximetil)IminoTRIS (hidroximetil)metano, Bis-TRIS (pH 6,5)		Merck
Ácido N-(2-hidroxietil)piperazin-N'-2-etansulfónico, HEPES (pH 7,4)		Sigma
Solución amortiguadora de Britton-Robinson (pH 5,1)	H_3PO_4 y CH_3COOH	Panreac
Solución amortiguadora de fosfato, PBS (pH 7,4)	Na_2HPO_4 y $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Merck
Acetato de amonio (pH 6,5 y 7,4)	$\text{NH}_4(\text{CH}_3\text{COO})$	Merck

Capítulo 7

Procedimientos experimentales

En este Capítulo se detallan los procedimientos experimentales de las valoraciones y medidas realizadas en la presente Tesis. Los diferentes apartados están relacionados con las técnicas analíticas utilizadas: voltamperometría diferencial de impulsos, espectrometría de masas, valoraciones calorimétricas y espectrofotometría UV-vis.

7.1. Estudios por técnicas voltamperométricas

Para las valoraciones voltamperométricas metal/ligando se prepara una disolución amortiguadora de pH con una concentración de electrolito soporte de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ de KNO_3 o $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaClO_4 . En estas valoraciones se introducen 20 mL de la disolución amortiguadora en la celda electroquímica, se desoxigena con nitrógeno durante 20 minutos, se registra el blanco para comprobar la ausencia de contaminantes y se guarda el archivo correspondiente, tanto en el formato propio del software como en .txt o .ascii, para poder abrirlos posteriormente en el entorno de Matlab. Después se hace una adición del ión metálico o del ligando (concentración $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ en la celda), dependiendo del tipo de valoración, directa o inversa que se vaya a realizar, se registra el voltamperograma y se comprueba la reproducibilidad del pico. A continuación, se lleva a cabo la valoración añadiendo progresivamente el volumen requerido de metal o ligando según la relación $[\text{M}]/[\text{L}]$ que se pretenda obtener. Después de cada adición la disolución se desoxigena durante 60 segundos para asegurar la ausencia de oxígeno durante todo el experimento y finalmente se registra el voltamperograma y se guarda.

En esta Tesis se presenta un trabajo en donde se realizan valoraciones polarográficas con la finalidad de estudiar la competitividad de los tres metales (cadmio, plomo y cobre) para formar los complejos con las fitoquelatinas. En este estudio se dispone en la celda una disolución equimolar de los tres metales y se valora con la disolución de fitoquelatina. En el caso de la valoración inversa, la disolución de fitoquelatina se dispone en la celda y se añade la mezcla equimolar de los metales.

En otros dos trabajos se llevan a cabo diferentes valoraciones de pH tanto de ligando como mezclas de metal y ligando. En estas valoraciones se sigue el mismo procedimiento que en las anteriores con la diferencia que la disolución de trabajo contiene el ligando a una concentración de $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ o la mezcla metal/ligando y el electrolito inerte $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ (KNO_3) a un pH de 2 y sobre esta disolución se hacen sucesivas adiciones de hidróxido para así hacer las medidas a diferentes pH. En el caso de la valoración del captopril, se prepararon independientemente disoluciones a diferentes pH utilizando una disolución amortiguadora de Britton-Robinson y $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de NaClO_4 como electrolito inerte y posteriormente se fueron midiendo cada una de las disoluciones por separado.

Los parámetros instrumentales utilizados en las valoraciones DPP han sido los siguientes: amplitud del impulso 0,05 V, tiempo del impulso 0,05 s, tiempo de la gota 1 s y un área de gota de mercurio de 0,9 mm².

Las medidas por voltamperometría cíclica (CV) que se llevaron a cabo para la aplicación de voltamperometría de eliminación con barrido lineal (EVLS) en el sistema BAP:cobre(II), se realizaron a velocidades de barrido entre 50 y 400 mV/s, en el intervalo de potenciales entre -0,1 y -1,6 V

El trabajo realizado durante la estancia doctoral en la Universidad de Linköping consistió en la evaluación de un nuevo sensor voltamperométrico que incorpora una unidad de autopulido. La señal de potencial que se aplica consiste en una sucesión de impulsos anódicos y catódicos alternados, de una duración de 50 ms, desde un potencial de 0,2 V a un potencial final de -1,4 V (Figura 23), registrando 140 puntos por barrido (20 impulsos x 7 puntos registrados por impulso) para su posterior análisis quimiométrico. La celda electroquímica en estos estudios consiste en un electrodo de trabajo y un auxiliar ambos incorporados en el sensor (como se ha detallado en el apartado 6.1.1).

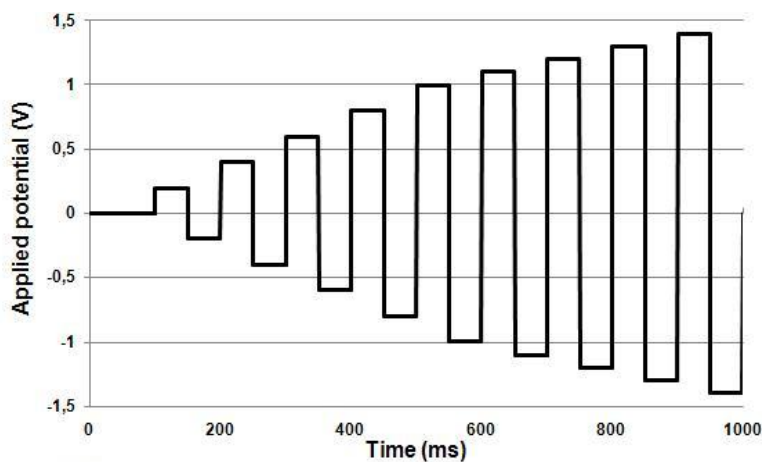


Figura 23. LAPV aplicados en los estudios realizados en la Universidad de Linköping

Los procedimientos experimentales de los tres sistemas en los que se optimizó el autopulido de este sensor voltamperométrico son los siguientes:

Se evaluó el sensor voltamperométrico con disoluciones de diferente concentración de urea. Para ello se disponen en la celda electroquímica 50 mL de una disolución amortiguadora de pH 0,1 mol L⁻¹ de fosfato (PBS) y se hacen adiciones de urea para determinar después las concentraciones.

Para la evaluación del contenido en grasa de diferentes leches comerciales se dispone una muestra de leche de 200 mL directamente en la celda electroquímica, previamente calentada a 20 °C con un calentador eléctrico.

En el caso de aguas residuales preparadas a partir de la disolución sintética y agua de consumo, se procedió disponiendo 50 mL de agua de consumo en la celda electroquímica para, posteriormente, añadir diferentes proporciones de agua residual sintética preparada tal como se ha explicado anteriormente (apartado 6.2.2) y de aguas residuales reales de la planta de tratamiento de aguas de Linköping.

7.2. Medidas por espectrometría de masas (ESI-MS)

Los estudios de espectrometría de masas se han realizado mediante ionización por electrospray en modo positivo. Las muestras se preparan en una disolución amortiguadora 0,02 mol L⁻¹ de acetato de amonio/amoniaco con valores de pH entre 5,1 y 7,4 (dependiendo del sistema estudiado). Esta disolución se desoxigena previamente para evitar la oxidación de los grupos tiol. Se utilizó este medio y no el utilizado en las valoraciones voltamperométricas porque el utilizado en las valoraciones DPP es poco volátil y da muchas señales en el espectro, lo que dificulta la detección de las señales de interés.

Se inyectó directamente un volumen de 50 µL de muestra utilizando una fase móvil 1:9 acetonitrilo:acetato de amonio (5 mmol L⁻¹) al mismo pH en el que se disolvieron las muestras. Las condiciones experimentales fueron las siguientes:

- Velocidad de flujo de 0,1 mL min⁻¹.
- Temperatura de la fuente de ionización entre 150 y 300°C.
- Potencial aplicado al capilar entre 3200 y 4000 V.

- Intervalos de registros del espectro (m/z) entre 100 y 3000.

7.3. Valoraciones por ITC

En el estudio de los agentes quelantes con arsénico (III) se realizaron valoraciones calorimétricas isotérmicas a una temperatura de 25° C. Las valoraciones con ambos ligandos se llevaron a cabo de forma directa e inversa con disoluciones desoxigenadas previamente, antes de colocarlas en la celda de trabajo o en la jeringa. En la valoración directa, se preparó una disolución de ligando en un medio de 0,02 mol L⁻¹ de HEPES a un pH de 7,4 y se introdujo en la celda para ser valorada con el metal (dispuesto en la jeringa). En el modo inverso se procedió de la misma manera, pero valorando el metal con el ligando.

En las diferentes valoraciones se ajustó tanto el volumen de las adiciones de valorante como el tiempo de espera entre inyecciones con tal de que la señal recuperase la línea base. Con el objetivo de tener en cuenta todos los efectos térmicos ajenos a la propia interacción (como, por ejemplo, el calor de la mezcla, el de dilución o el de intercambio de protones), se realizó una valoración adicional, llamada valoración de dilución. Ésta consiste en hacer adiciones del valorante a la disolución amortiguadora de pH (sin metal ni ligando), utilizando los mismos parámetros experimentales que en la valoración del estudio de la interacción metal-ligando. Tras la substracción de la valoración de dilución a los datos de la valoración metal/ligando, se analizan los datos resultantes y se determinan los parámetros termodinámicos de los diferentes sistemas estudiados.

7.4. Estudio por espectrofotometría UV-vis

En el estudio del sistema cobre(II)/bencilaminopurina se realizaron valoraciones por UV-vis con el fin de combinar estas valoraciones con las obtenidas polarográficamente. Se realizaron tanto valoraciones directas como inversas reproduciendo las mismas relaciones metal/ligando, o viceversa, que las estudiadas por voltamperometría y utilizando concentraciones del mismo orden de magnitud.

Las disoluciones se prepararon previamente a partir de una disolución amortiguadora de pH, en este caso 0,1 mol L⁻¹ de disolución reguladora de Britton-Robinson a un pH de 5,1, y las concentraciones de ligando y metal necesarias. Los parámetros de las medidas fueron: intervalo del espectro entre 600 y 200 nm, velocidad de barrido 480 nm/min, tiempo de respuesta 0,2 s y abertura de 2,00 nm. En la cubeta de referencia se dispone la disolución amortiguadora que actúa de blanco. A continuación se disponen sucesivamente en la cubeta de trabajo (con un camino óptico de 10 mm) las diferentes muestras preparadas. Entre medida y medida la cubeta se limpia con agua ultrapura y se aclara con la siguiente disolución de medida, para a continuación llenarla con ésta y se procede a la medida. Se registran dos o tres espectros de cada medida para comprobar la reproducibilidad de la señal, y se guardan en el formato propio del software y en formato .ascii, con el fin de abrirlos posteriormente en el entorno de Matlab.

Parte IV.

Resultados y discusiones

Capítulo 8

Desarrollo de la metodología quimiométrica PSF-GPA

Este capítulo contiene dos artículos en los cuales se presenta una nueva metodología quimiométrica desarrollada durante esta Tesis con el fin de analizar datos voltamperométricos no lineales mediante la resolución multivariante de curvas. En el primer artículo se desarrolla la metodología Parametric Signal Fitting (PSF), la cual propone el ajuste de ecuaciones paramétricas para la modelización de las señales. En el caso particular de los datos voltamperométricos se propone que sea por medio del ajuste de dos ecuaciones gaussianas, una a cada lado del potencial de pico (Gaussian Peak Adjustment, GPA). En el segundo trabajo se dota al programa GPA de dos restricciones transversales que incrementan la consistencia de los resultados. Estas restricciones ajustadas por mínimos cuadrados crean un nexo de unión entre las diferentes medidas a lo largo del conjunto de datos. El programa fue llamado GPA2D y sus dos restricciones de trabajo se basan: i) en el ajuste del movimiento de las señales en el caso de valoraciones de pH y ii) en el ajuste de constantes de equilibrio químico en el caso de sistemas metal/ligando.

8.1. Introducción

La aplicación de metodologías quimiométricas para la identificación de modelos químicos a partir de datos electroquímicos ha abierto la posibilidad de estudiar sistemas complejantes cuyo comportamiento electroquímico no permite utilizar las metodologías clásicas. Tal como se ha visto anteriormente, el planteamiento clásico del estudio de sistemas complejantes se basa en la aplicación de una estrategia de *hard modelling* en la que se postula un modelo físico-químico a partir de ecuaciones fundamentales (leyes de Fick, ecuación de Nernst) para, tras la resolución analítica o numérica del mismo, ajustar los parámetros de las ecuaciones del modelo a los datos experimentales. Dentro de estos modelos, los más relevantes y más ampliamente utilizados son los de Lingane [116], DeFord y Hume [43] y DeJong et al. [44-46] para la formación de complejos sucesivos y para macromoléculas, respectivamente.

Sin embargo, en muchos casos el establecimiento de un modelo teórico es muy complicado debido a la complejidad de los procesos implicados (fenómenos de transporte de las especies y/o procesos electroquímicos). En estos casos, otra aproximación global válida sería el uso de la quimiometría que, tal como se ha comentado anteriormente, se basa en obtener resultados o identificar modelos a partir del análisis matemático y estadístico de los datos voltamperométricos. Así, metodologías quimiométricas como la resolución de curvas multivariante por mínimos cuadrados alternados (MCR-ALS), aparecen como herramientas potentes y versátiles para el tratamiento de datos voltamperométricos. Esta metodología quimiométrica se utiliza comúnmente en el análisis de datos espectroscópicos [33], aunque ha sido adaptada por el grupo de Electroanálisis para poder aplicarse a datos electroquímicos, concretamente voltamperométricos [32]. Su aplicación, independientemente de la naturaleza de los datos, requiere la bilinealidad del sistema. Este requisito restringe su uso a medidas electroanalíticas donde se produzcan procesos que aseguren este comportamiento. El sistema complejante metal-ligando ideal sería aquel en el que se forman complejos inertes, donde las señales de metal libre, los complejos y, eventualmente, del ligando libre se mantienen en un potencial fijo a lo largo de todo el experimento [97]. En estos casos, MCR-ALS proporciona un perfil de concentración y la respuesta (señal) pura correspondiente para cada componente. Los resultados obtenidos son muy útiles para la interpretación del comportamiento electroquímico de los sistemas estudiados y proporcionan información sobre la estequiometría de los

complejos formados y sobre su estabilidad. Sin embargo, la necesidad de que las señales permanezcan fijas a un mismo potencial y que las intensidades de todas las especies electroactivas dependan linealmente de sus concentraciones no siempre se cumple, por lo que el análisis mediante MCR-ALS se hace en muchos casos difícil o se ve comprometido.

Muchos sistemas complejantes sobre los que se quiere obtener información mediante técnicas voltamperométricas no presentan un comportamiento totalmente inerte desde el punto de vista electroquímico, ya que los complejos formados se disocian de manera significativa durante el tiempo de medida, lo que da lugar a un desplazamiento progresivo de las señales a lo largo del eje de potencial y, por lo tanto, a una pérdida de linealidad de los datos. En los casos donde la pérdida de linealidad no es muy significativa, el MCR-ALS se puede aplicar con una precisión razonable, pero hay casos en los que la pérdida de linealidad es muy importante y entonces el análisis MCR-ALS resulta imposible o da lugar a resultados poco realistas.

Con el fin de resolver este problema se desarrollaron en el grupo de investigación dos algoritmos, *shiftfit* [49,50] y *pHfit* [51], los cuales corrigen el desplazamiento de las señales en la matriz de datos. La herramienta *shiftfit* optimiza por mínimos cuadrados el cambio de potencial de cada voltamperograma puro con respecto a una posición de referencia. Este programa funciona razonablemente bien cuando sólo unas pocas señales se están moviendo y no se solapan unas con otras. En cambio, *pHfit* puede resolver comportamientos más complejos, como los encontrados en las valoraciones voltamperométricas de pH, mediante la imposición de unas restricciones en el movimiento de las señales según una función que varía con el potencial. En ambos casos, el uso combinado de las correcciones de potencial y MCR-ALS a datos de diferentes sistemas experimentales mostró que la mayor parte de la falta de ajuste se debía a la etapa de corrección y que la posterior aplicación del MCR-ALS a la matriz de datos corregida apenas cambiaba los perfiles de concentración estimados en la etapa de corrección. Esto sugiere que los programas de *shiftfit* y *pHfit* puedan entenderse no como un paso preliminar a la aplicación de MCR-ALS, sino como un método alternativo para proporcionar perfiles de concentración fiables sin necesidad de utilizar el algoritmo MCR-ALS.

Ambas estrategias *shiftfit* y *pHfit* se han aplicado satisfactoriamente a datos voltamperométricos, pudiéndose utilizar con señales de cualquier forma. La única restricción es que la forma de la señal unitaria de cada componente sea constante, es decir, permanezca sin cambios a lo largo de todo el experimento, excepto por la altura y la posición en el eje de potencial, las cuales son ajustadas por el programa.

Sin embargo, existen sistemas donde se producen cambios en la reversibilidad electroquímica, lo que puede modificar la forma de los picos, ensanchándose, estrechándose o modificándose la simetría de los mismos, y consecuentemente esto provoca una pérdida de linealidad. Esta fuente de no linealidad afecta drásticamente al rendimiento de las herramientas *shiftfit* y *pHfit* ya que estos algoritmos pueden compensar el posible desplazamiento de las señales, siempre y cuando la forma de éstas se mantenga constante, pudiéndose ajustar un voltamperograma unitario para cada especie. Si se producen cambios en la anchura de pico de los diferentes componentes, se obtiene un conjunto de señales puras optimizadas que serán un promedio aproximado de las formas cambiantes presentes durante el experimento y, como consecuencia, se obtiene una gran falta de ajuste en el tratamiento.

Con el objetivo de poder tratar datos voltamperométricos independientemente de su linealidad, en el presente capítulo se presentan dos artículos donde se propone una nueva estrategia quimiométrica para el análisis de datos voltamperométricos cuando las señales puras no mantienen una forma constante a lo largo del experimento, pudiendo variar su posición, forma o simetría. Esta nueva metodología se basa en el ajuste paramétrico de señales (Parametric Signal Fitting, PSF) a través de funciones que puedan reproducir la forma de éstas. Como en los datos voltamperométricos la forma de la señal analítica es un pico gaussiano, como primera aproximación se desarrolló el algoritmo GPA (Gaussian Peak Adjustment), el cual ajusta dos funciones gaussianas, una a cada lado de la señal, y sus parámetros se optimizan por mínimos cuadrados. Estos parámetros determinan no sólo la altura y la posición de las señales (como en los algoritmos anteriores), sino también la anchura a media altura a ambos lados. Este doble ajuste por señal permite solucionar de antemano la aparición de picos asimétricos. Es importante señalar que, a diferencia de *shiftfit* y *pHfit*, el uso de funciones gaussianas restringe el nuevo algoritmo exclusivamente a las señales en forma de pico.

8.2. Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment: A new multivariate curve resolution method for non-bilinear voltammetric measurements.

Santiago Cavanillas, José Manuel Díaz-Cruz, Cristina Ariño, Miquel Esteban.

Analytica Chimica Acta 689 (2011) 198–205.



Contents lists available at ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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

Parametric signal fitting by gaussian peak adjustment: A new multivariate curve resolution method for non-bilinear voltammetric measurements

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

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

ARTICLE INFO

Article history:

Received 5 November 2010

Received in revised form

26 December 2010

Accepted 10 January 2011

Available online 18 January 2011

Keywords:

Voltammetry

Multivariate curve resolution (MCR)

Non-linearity

Gaussian peak adjustment (GPA)

Potential shift

Peak broadening

ABSTRACT

A new methodology based on the fitting of signals to parametric functions is proposed for the multivariate curve resolution (MCR) analysis of overlapping and peak-shaped voltammetric signals which progressively get broader or narrower and move along the potential axis, thus causing a dramatic loss of linearity. The method is based on the least squares fitting of gaussian functions at both sides of the peaks by using adjustable parameters for the peak height, position and symmetry. It consists of several home-made programs written in Matlab environment, which are freely available as supplementary material of the present work. The application to the systems Zn(II)-oxalate, and to the phytochelatin PC₅ in a wide pH range provides excellent results as compared to these of more conventional linear methods, which raises good expectations about future application to electrochemical and even non-electrochemical data.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The application of Chemometrics to electroanalytical measurements has been quite scarce up to now as compared to the widespread use in the analysis of spectroscopic data [1–3]. Among the reasons for that, it can be mentioned the electrochemical tradition of *hard modelling* through fundamental equations (Fick's Laws, Nernst Equation) and the lack of linearity of many electrochemical processes, which prevents an accurate use of many chemometrical methods designed for linear data [3].

Multivariate curve resolution (MCR) methods constitute a good example for that. The especially versatile alternating least squares algorithm (MCR-ALS) was developed by Tauler et al. for spectroscopic data [4] and in a few years it has become quite popular [5], but most of their applications have remained in the field of spectroscopic measurements. As for the electroanalytical uses of MCR-ALS, they started quite early [6], but the bilinearity requirements of the method have restricted them to voltammetric measurements on a few particular systems which ensure such a linear behaviour. This is the case of electrochemically inert metal complexes, where the signals of the free metal, the complexes and, eventually, the free ligand remain at fixed potential along the whole experiment [7]. Unfortunately, this is not the usual situation in metal complexa-

tion studies by voltammetry. In most cases, the complexes are not totally inert from an electrochemical point of view, i.e., they significantly dissociate during the time taken by the measurement, which causes a progressive shift of the signals along the potential axis and, hence, a loss of data linearity.

This can be qualitatively detected by a too large number of components or latent variables required to reproduce the matrix in principal component analysis (PCA) or partial least squares (PLS) with an acceptable error. However, from a quantitative point of view, it is difficult to measure the extent of non-linearity. In systems where the number of expected components is known, the percentage of linearity could be measured as the percentage of PCA data reproduction with this prefixed number of components, but this is quite an exceptional situation in voltammetry.

In the most favourable situations, the linearity decrease is not important and MCR-ALS can be applied with reasonable accuracy, but quite often the potential shift of the signals is so huge that MCR-ALS analysis becomes impossible or provides unrealistic results.

In order to solve this problem, the *shiftfit* [8,9] and *pHfit* [10] algorithms were recently proposed. The first one corrects the data matrix from signal movements prior to the application of MCR-ALS. For this purpose, it optimises by least squares the potential shift of every pure voltammogram with respect to a reference position. This program works reasonably well when only a few signals are moving without overlapping with each other. The second algorithm can solve more intricate systems like those encountered in voltammetric pH titrations by imposing a shape restriction to the

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

movements of the signals as a function of potential, by means of adjustable sigmoid or linear functions. In both cases, the combined use of the potential shift correction and MCR-ALS in different experimental systems showed that most of the lack of fit was due to the correction step and also that the further application of MCR-ALS to corrected data hardly changes the concentration profiles estimated during the potential shift correction. This suggests that *shiftfit*/*pHfit* programs can be understood not as a preliminary step in MCR-ALS, but as an alternative approach to provide reliable concentration profiles without using ALS algorithm.

Although both *shiftfit* and *pHshift* strategies have been applied to peak shaped signals, they could be used with any type of shape: the only restriction is that the pure signals of all components must remain unchanged along the whole experiment except for the height and the x-axis position, which are adjusted by the program.

Nevertheless, losses of electrochemical reversibility, which are among the most usual non-linearity sources in voltammetric data, can dramatically affect the performance of both *shiftfit* and *pHfit* algorithms. The reason for that is the progressive broadening (and even the changes in peak symmetry) which take place as the electrochemical process becomes more irreversible. The mentioned algorithms could compensate the potential shift of pure signals whose shape remains unchanged, but they cannot cope with signals continuously changing their width and symmetry. As a result, a poor lack of fit is achieved and sets of optimised pure signals are obtained which contain a rough average of the changing shapes exhibited during the experiment.

In the present work a new strategy, parametric signal fitting (PSF), is proposed for the chemometric analysis of voltammetric data when the pure signals do not maintain a constant shape. This is based on the fitting of parametric functions to reproduce the shape of the signals. As a first approach, two gaussian functions are fitted, one at each side of the signal, and the parameters are least-squares optimised by means of a new algorithm termed as gaussian peak adjustment (GPA). Such parameters determine not only the height and position of the signals (as in the algorithms above), but also the width at both sides of the maximum. It is important to note that, unlike *shiftfit* and *pHfit*, the use of gaussian functions restrict the new algorithm exclusively to peak-shaped signals. Moreover, it must be remarked that, despite fitting of gaussian peaks has been already used in some situations such as the resolution of UV–vis spectra [11], in such approaches the symmetric character of the gaussian function prevents an appropriate treatment of asymmetric signals. In the proposed method, the use of two separated gaussian functions at both sides of the maximum (sharing the same height and position but different widths) is a new and simple solution for the fitting of asymmetric peaks.

The procedure is based on the home-made program GPA designed for Matlab environment [12], which is freely available, together with other complementary files as a supporting material of the present work. As a first approach, the new methodology has been tested in the system Zn(II)–oxalate, which presents a continuous broadening of differential pulse polarographic (DPP) peaks as oxalate is being added to a Zn(II)-ion solution [13]. Further, the pH titration of a phytochelatin PC₅ solution is considered, which produces more extreme potential shifts and signal broadening, as shown by preliminary studies where *pHfit* could not substantially improve the poor results of MCR-ALS [14].

2. Theory

In the proposed GPA algorithm each voltammetric signal is fitted to a couple of gaussian peaks, one on the left of the maximum and the other on the right. The equations for both sides of the peak are:

$$I_{\text{left}} = c \exp\{-b(E - a)^2\} \quad (1a)$$

$$I_{\text{right}} = c \exp\{-d(E - a)^2\} \quad (1b)$$

where Eq. (1a) is valid for potential values (E) verifying $E \leq a$ and Eq. (1b) holds for $E \geq a$. The adjustable parameters a and c determine the position and height of the peak, respectively, and are common to both gaussian functions. At $E = a$, both functions converge in the maximum so that $I_{\text{left}} = I_{\text{right}} = c$. As for b and d parameters, they are specific of each function and are related to the width at each side of the peak. Hence, they determine the half peak width ($w_{1/2}$) of the signal:

$$\begin{aligned} w_{1/2} &= w_{1/2,\text{left}} + w_{1/2,\text{right}} = \sqrt{\frac{\ln 2}{b}} + \sqrt{\frac{\ln 2}{d}} \\ &= \sqrt{\ln 2} \left(\frac{1}{\sqrt{b}} + \frac{1}{\sqrt{d}} \right) \end{aligned} \quad (2)$$

The area of such a hybrid gaussian peak can be easily computed from the integral of both half functions:

$$\begin{aligned} \text{Area} &= \int_{-\infty}^a c e^{-b(E-a)^2} dE + \int_a^{\infty} c e^{-d(E-a)^2} dE = \frac{c}{2} \sqrt{\frac{\pi}{b}} + \frac{c}{2} \sqrt{\frac{\pi}{d}} \\ &= \frac{c\sqrt{\pi}}{2} \left(\frac{1}{\sqrt{b}} + \frac{1}{\sqrt{d}} \right) \end{aligned} \quad (3)$$

It must be noted that in the case of irreversible processes, the area of differential pulse signals can be a better indication of the concentration than the peak height (given by c parameter). Additionally, the symmetry of the peak is determined by the ratio b/d : the more different from one the ratio is, the more asymmetric the peak is.

Fig. 1 summarizes the main steps of the fitting procedure. First, a reference signal must be defined for every component (e.g., by using *peakmaker* program) and integrated into the **esv** matrix. Additionally, a matrix (**isshift**) must be filled according to the corresponding existence ranges (in the example shown in Fig. 1, from experiment 1 to 12 for the first component and 2 to 12 for the second one) and the type of movement and/or broadening of the signals (expressed with the digits 1 or 0). For more involved existence ranges (e.g., if a component disappears and appears later), the matrix **csel** can be used. Then, the reference signals are fitted to Eqs. (1a) and (1b) to obtain initial estimations of a , b , c and d parameters. It must be pointed out that the accuracy of the estimated signals is key to obtain a small lack of fit, especially if some parameters such as peak position or width remain constant throughout the experiment. At this point, a least squares fitting is started where such parameters are optimised so that the sum of all peaks along the full set of experiments produce a reproduced matrix (I_{rep}) as similar as possible to the matrix containing all experimental voltammograms (I_{exp}). The difference is monitored by using the well-known expression for the lack of fit (lof). The program also computes the corrected matrix (I_{cor}) which one would obtain in the absence of changes in peak position, width and symmetry. Once convergence is achieved, the evolution of all four parameters as a function of the experiment number is obtained and, hence, it is possible to compute the evolution of the concentration (from peak heights or areas), the peak potential and the half-peak width of every component.

3. Experimental

3.1. Chemicals and instrumentation

Zn(NO₃)₂·4H₂O and KNO₃ were Merck analytical grade. Zn solutions were prepared from 10⁻² mol L⁻¹ stock solutions, previously

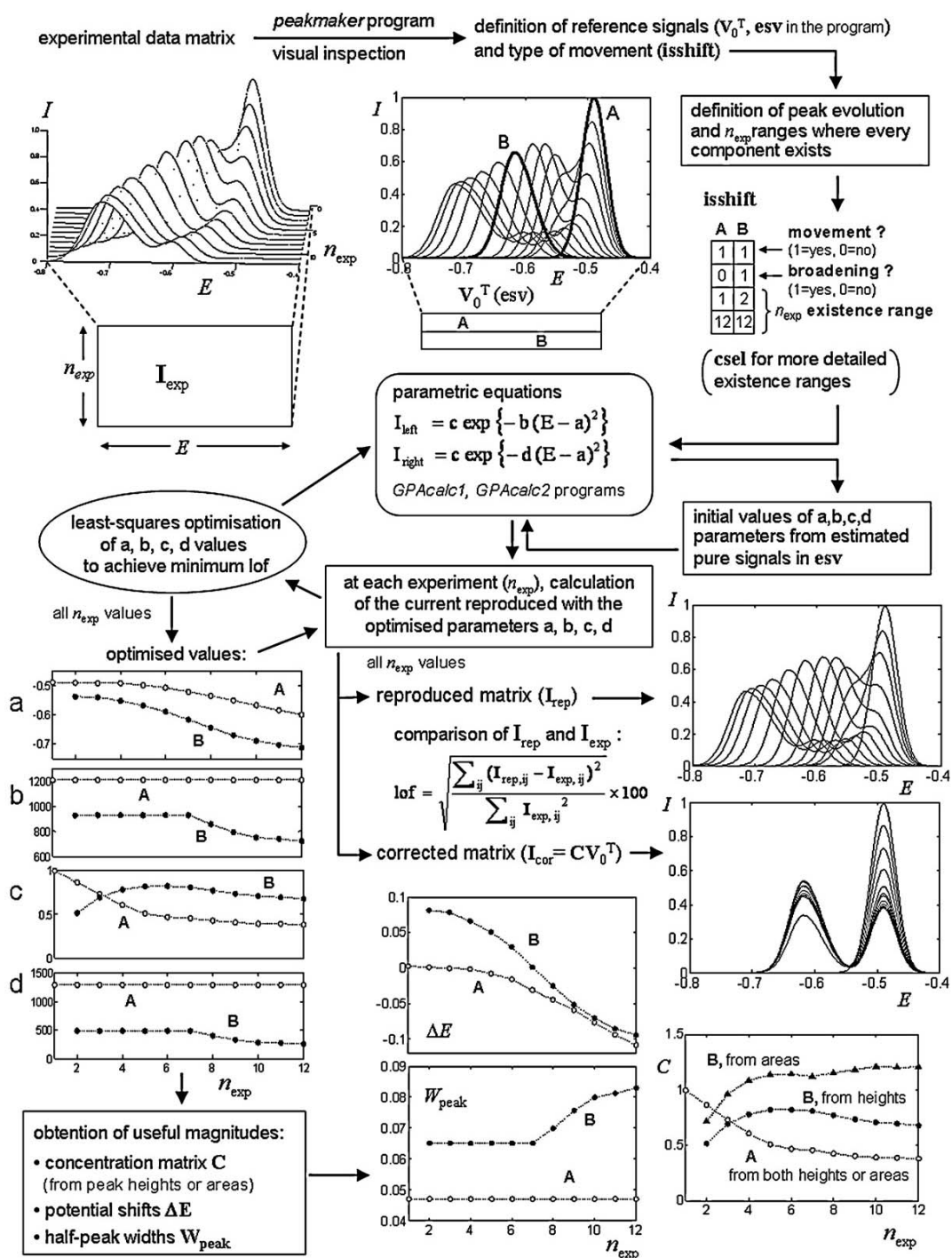


Fig. 1. Flowchart of the proposed methodology.

standardised by complexometric titration. Carlo Erba supplied potassium oxalate (pure reagent grade). HNO_3 and KOH solutions were prepared from Titrisol (Merck) and diluted, if necessary, to obtain solutions of lower concentration. The phytochelatin PC_5 , (γ -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 Mix-mate. Ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 water purification system) was employed in all experiments.

Voltammetric measurements were performed using a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal com-

puter 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 mm², Ag/AgCl, KCl (3 mol L⁻¹), and glassy carbon respectively, all of them from Metrohm. Double distilled Hg was used. The instrumental parameters for the 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 0.05 V. pH measurements were made with an Orion SA 720 pH-meter. All the experiments were carried out at 20 °C and purified nitrogen (Linde 50) was used for solution deaeration.

3.2. Procedures

Measurements were done in a zinc solution at different concentrations of oxalate. First, 20 mL of 10⁻⁵ mol L⁻¹ Zn solution, also containing 0.16 mol L⁻¹ of KNO₃ at pH 6 were poured into the cell and, after deoxygenation with nitrogen during 20 min, a DPP scan was recorded. Then, successive additions of oxalate solution were carried out and the corresponding DPP curves were recorded.

Measurements on PC₅ solution were done at different pH values. At the beginning of every experimental run, 20 mL of a solution 10⁻⁵ mol L⁻¹ in PC₅ and 0.1 mol L⁻¹ in KNO₃ were poured into the cell and deoxygenated, 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 2–12. After every addition, pH was measured and a new DPP curve was recorded.

4. Results and discussion

The proposed method has been tested in systems that were especially problematic in previous investigations on the application of MCR-ALS analysis due to large potential shifts and important peak broadening.

4.1. Oxalate–zinc system

In previous studies on the oxalate–Zn system [13] the DP polarograms could not be treated through any linear chemometric method, because of the progressive potential shift and the increasing width of the peak along the experiment. New DPP experiments carried out at lower concentration of zinc to prevent precipitation of the 1:2 complex, show again this trend (Fig. 2a). These data were analysed by GPA and the results compared with those obtained by MCR-ALS and *pHfit*.

The application of MCR-ALS with one component cannot adjust the position and width of the peaks, as evidenced by a too high lack of fit of 24.3%. Indeed, the singular value decomposition (SVD) of the experimental matrix (Fig. 2b) suggests that at least two components are required to explain data variation. Then, if two components are used, the system can be explained with an acceptable lack of fit of 6.6% (Fig. 2c). This is because the second component accounts for the changes of position and width of the peak and every peak is explained as an average of the narrow initial peak on the right and the wide final peak on the left. However, this linear modelling produces some noticeable patterns in the error matrix (Fig. 2d) especially in the extremes of the peak.

When *pHfit* program was applied (Fig. 2e,f), the shift of the peaks could be adjusted, but not the increasing width, which produced a too high lack of fit of 17.8% (Fig. 2d).

In contrast, when the experimental data matrix was treated with GPA, the adjustment of the peaks to a double gaussian allowed a satisfactory data reproduction (Fig. 2g,h) with a much lower lack of fit of 4.6%. Fig. 3 summarizes the results of such fitting. The optimized parameters *a–d* (Fig. 3a–d) allow one to compute

Table 1

Overall stability constants for the Zn(II)+oxalate system, in 0.16 mol L⁻¹ KNO₃, obtained by fitting the experimental data to Leden equation corrected by areas of the peak. The results are compared to some literature data.

	This work	Ref. [13]	Ref. [15]
log β ₁	3.84	3.52	3.88
log β ₂	6.65	6.83	6.40

the evolution of the peak potential (Fig. 3e), the half peak width (Fig. 3f), the peak height (Fig. 3g) and the peak area (Fig. 3h). The progressive potential shift evidences labile complexation of Zn(II) with oxalate, but also possible losses of electrochemical reversibility of Zn(II) reduction, as suggested by the continuous widening of the peak and the virtually constant area. This last observation practically discards the formation of insoluble zinc species.

With the parameters calculated by GPA the overall stability constants were estimated for 1:1 and 1:2 Zn:C₂O₄²⁻ complexes in the same way as in [13], but using the ratio between peak areas instead of the ratio between peak currents. Although the measurements could be affected by electrochemical irreversibility, the values were compared with the literature (Table 1) and they appeared to be very coincident. Thus the results show that the program is enough accurate to find parameters which allow us to apply hard modelling strategies to understand the behaviour of the systems studied.

4.2. PC₅ behaviour along pH titrations

In a previous work [14], the electrochemical behaviour of the phytochelatin PC₅ was studied by DPP along a wide pH range (2–9). The main problem to resolve this system was the existence of many overlapping peaks moving along the potential axis, which dramatically reduced the linearity of the data. This fact totally hindered the application of a linear method like MCR-ALS. Moreover, when *pHfit* program was applied to account for potential shifts, the lack of fit obtained was still quite high as a consequence of the progressive broadening of some peaks, that *pHfit* was unable to model.

In this work, the experiments were repeated under similar conditions but scanning a wider pH range (2–12) to enhance the peak broadening and test the proposed method under quite extreme conditions. Fig. 4a shows the experimental data matrix obtained in this way, where three signals can be detected: i) the main peak, which is continuously moving from ca. –0.3 to –0.8 V and changing its width, ii) a very wide signal between –0.4 and –0.8 V, and iii) a narrow peak at ca. –0.9 V which predominates at the highest pH values and practically does not move. All these peaks are generated by the oxidation of the mercury of the electrode to form thiolate complexes [16] and provide information on the mercury-peptide binding. In the presence of metal ions different from mercury, they can also be used to monitor the bulk concentration of free peptide (i.e., not complexed by the metal ion). Among the three observed signals, the most interesting is the first one, which moves with pH because of the involvement of H⁺-ions in the electrochemical oxidation/reduction of the mercury/mercury thiolate system. If we assume that the largest variations of peak potentials and/or peak heights with pH should happen at pH values close to the pK_a of the groups involved in the binding, the study of the pH evolution of the mentioned peak can be used to identify such functional groups.

When SVD was applied (Fig. 4b), a practically asymptotic decrease of the singular values is noticed, which evidences the high degree of non-linearity of the data. For instance, the use of 9 components by principal component analysis (PCA) only explains

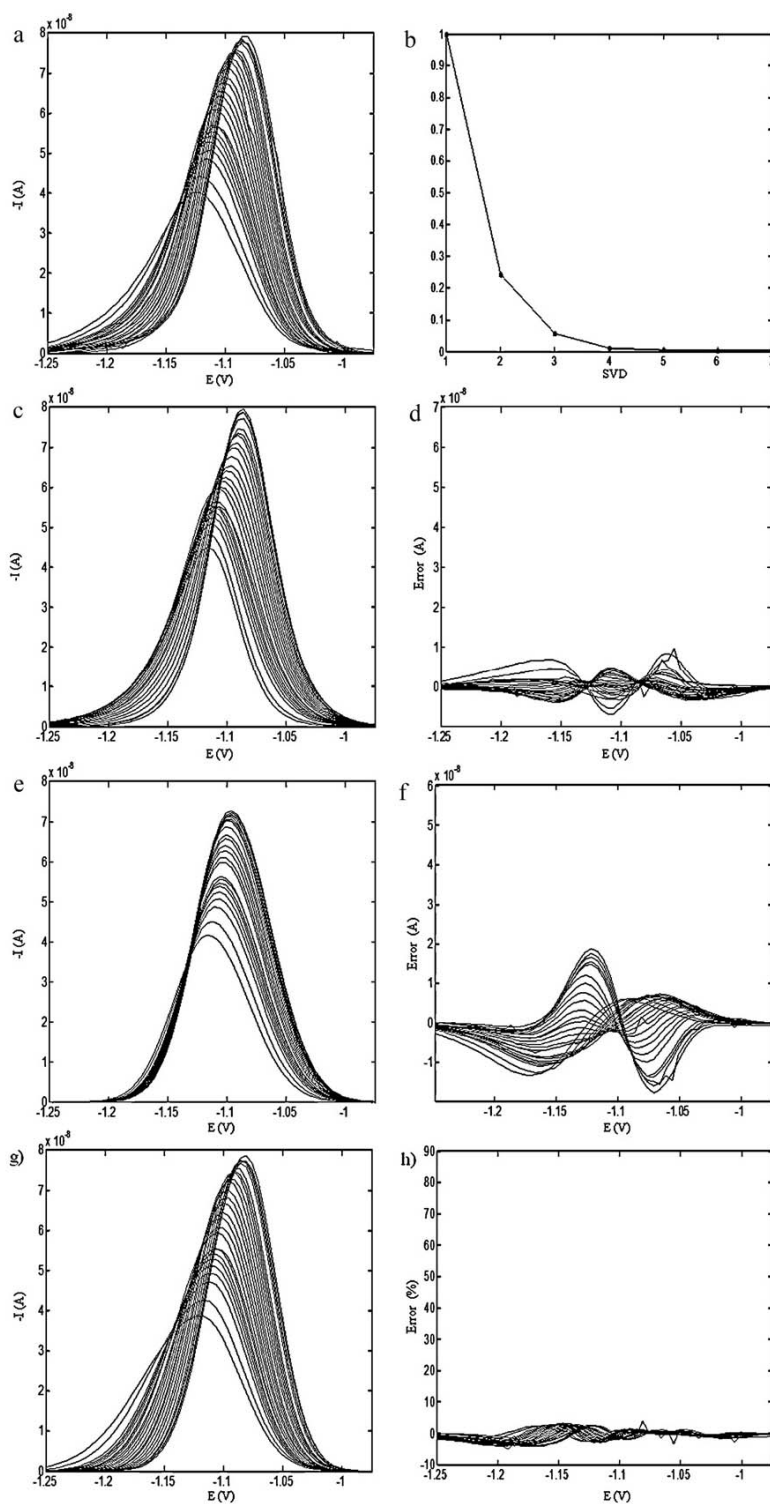


Fig. 2. (a) Experimental data matrix (current vs. potential), obtained by DPP titration of $\text{Zn(II)} 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ with oxalate in $0.16 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. (b) Singular value decomposition of the experimental matrix. (c,d) Reproduced and error matrix (current vs. potential) obtained by MCR-ALS. (e,f) Reproduced and error data matrix (current vs. potential) obtained by *pHfit*. (g,h) Reproduced (current vs. potential) and error matrix (% error vs. potential) obtained by GPA.

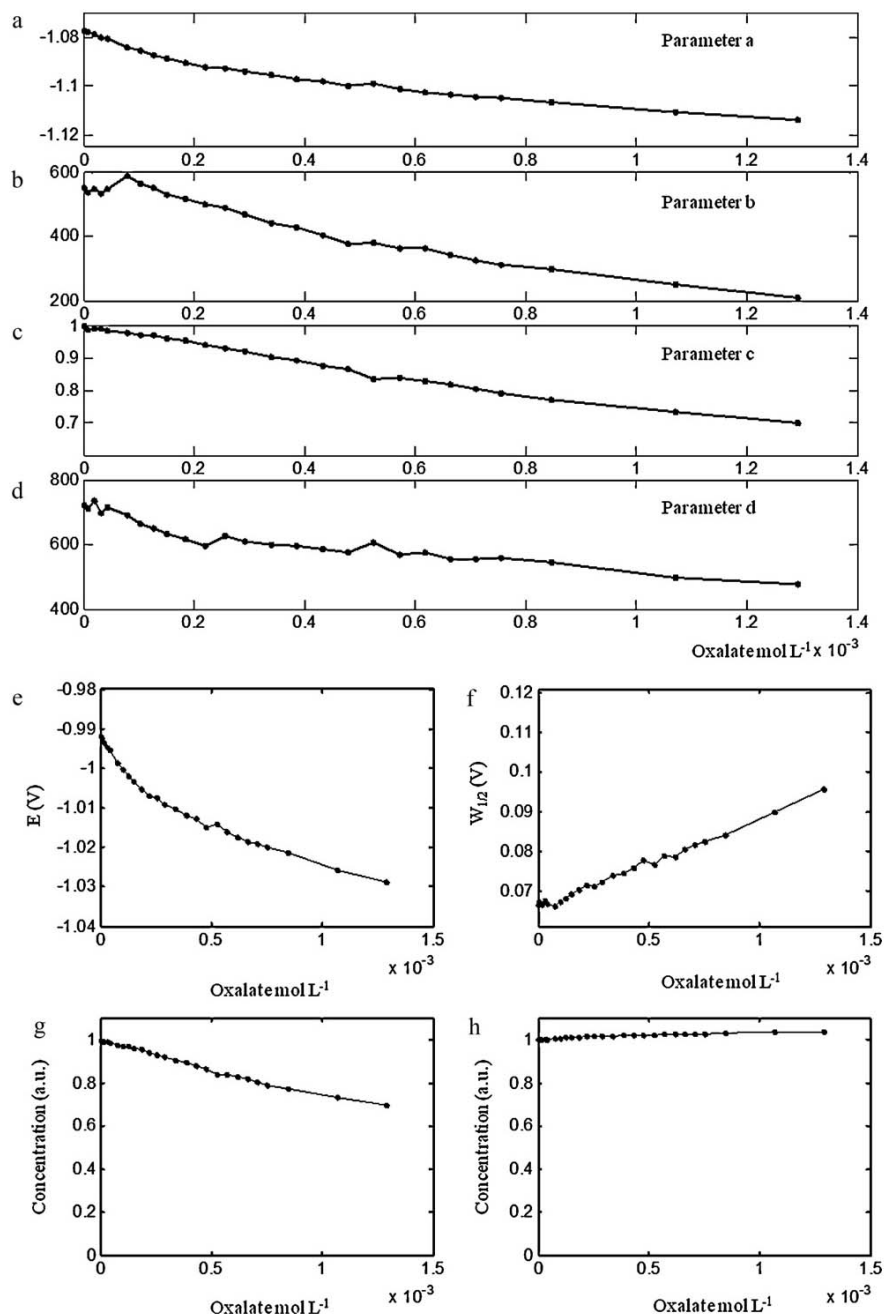


Fig. 3. Parameters *a* (a), *b* (b), *c* (c), *d* (d) fitted to the experimental data shown in Fig. 2 by GPA. From these values, the peak position (e), the half peak width (f), the peak height (g) and the peak areas (h) have been also computed.

89.0% of the data variance. In contrast, the application of GPA with 3 components produces satisfactory results. The options selected inside the **isshift** matrix allow the first component to move and broaden and the second and third components to broaden but not to move. Under these conditions, the program provides a good reproduction of the data matrix (Fig. 4c,d) with a lack of fit of 5.4%.

The concentration profiles of the first component calculated either from peak intensities (Fig. 4e) or peak areas (Fig. 4f) show a

similar evolution. In both cases two maxima can be observed at pH values close to 5 and 8, which suggest the binding of mercury by carboxylic and thiol/amino groups, respectively. However, when areas are used, the difference between the sizes of both observed maxima is minimized because calculation of areas corrects the decrease of height caused by peak broadening. For the other components, the intensity plot appears to be more robust against fitting errors. Finally, Fig. 4g and h describe the progressive evolution of the position and width of each signal.

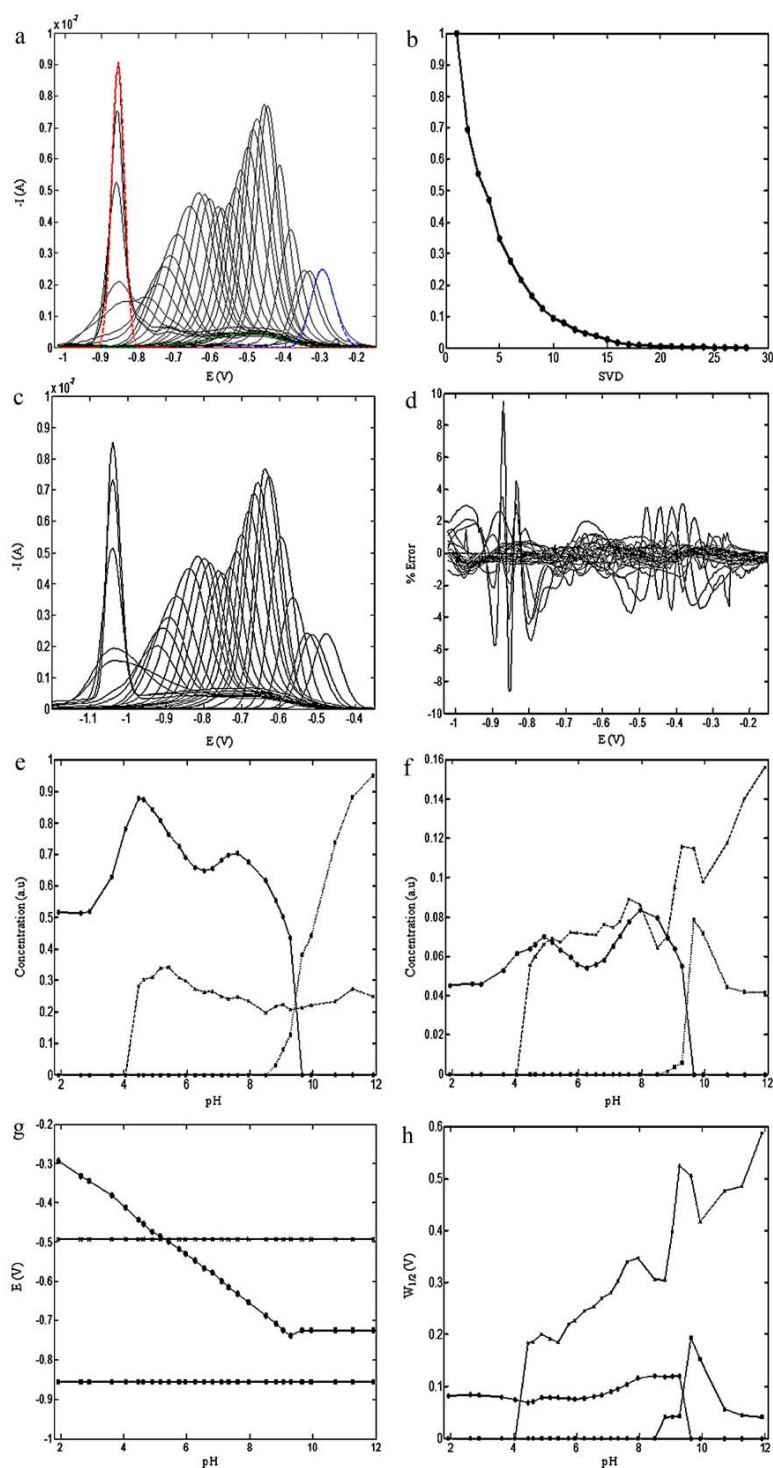


Fig. 4. (a) Experimental data matrix (current vs. potential) obtained by DPP titration of $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ PC₅ in 0.05 mol L^{-1} KNO₃ along the pH range 2–12; (b) singular value decomposition of the experimental matrix; (c,d) reproduced and error matrices obtained by GPA; (e) concentration profiles from intensities obtained by GPA; (f) concentration profiles from areas obtained by GPA; (g) GPA-fitted peak potentials as a function of pH; and (h) GPA-fitted half peak widths as a function of pH.

5. Conclusions

Parametric signal fitting appears to be a promising strategy for the multivariate curve resolution of non-bilinear data with characteristic signal patterns susceptible to be modelled

by parametric functions. In the design of these functions it is crucial to use parameters that can be easily related to the height, area, position and width of the signal for the sake of a fast optimization and a straightforward interpretation of the results.

In this work, the use of a double gaussian function (GPA algorithm) has successfully modelled the progressive potential shift and broadening of the DPP peaks in two characteristic experimental systems and has considerably improved the treatment by either MCR-ALS or *pHfit*. This encourages the study of additional parametric functions for modelling other kinds of electrochemical or even non-electrochemical signals.

Acknowledgments

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471), Santiago Cavanillas is grateful to MICINN for his Ph.D. grant (BES-2010-032352). The authors also acknowledge Hamid Abdollahi and Mojtaba Kooshki from IASBS of Zanjan, Iran, for useful comments.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.aca.2011.01.017](https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.01.017).

References

- [1] S.D. Brown, R.S. Bear Jr., *Crit. Rev. Anal. Chem.* 24 (1993) 99.
- [2] E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Electroanalysis* 14 (2002) 1533.
- [3] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86.
- [4] R. Tauler, A. Smilde, B.R. Kowalski, *J. Chemom.* 9 (1995) 31.
- [5] A. de Juan, R. Tauler, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 163.
- [6] J.M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B.S. Grabaric, M. Esteban, E. Casassas, *J. Electroanal. Chem.* 393 (1995) 7.
- [7] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M.S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 49.
- [8] A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Analyst* 133 (2008) 112.
- [9] A. Alberich, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Analyst* 133 (2008) 470.
- [10] J.M. Díaz-Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño, M. Esteban, *Analyst* 135 (2010) 1653.
- [11] Y. Hu, J. Liu, W. Li, *Anal. Chim. Acta* 538 (2005) 383.
- [12] Matlab version 7.3.0.267, Mathworks Inc. Natick, MA, USA, 2006.
- [13] F. Berbel, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.* 475 (1999) 99.
- [14] R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9006.
- [15] R.M. Smith, A.E. Martell, *Critical Stability Constants: Other Organic Ligands*, vol. 3, Plenum Press, New York, 1976, p. 94.
- [16] M. Heyrovský, P. Mader, S. Vavříčka, V. Veselá, M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.* 430 (1997) 103–117.

Tutorial of Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment (PSF-GPA)

Supplementary Material of the work:

Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment: a New Multivariate Curve Resolution Method for Non-bilinear Voltammetric Measurements

S. Cavanillas, J.M. Díaz Cruz*, C. Ariño and M. Esteban

Departament de Química Analítica. Universitat de Barcelona
 Martí i Franquès, 1-11, E – 08028 – Barcelona (Spain)
 E-mail: josemanuel.diaz@ub.edu

FILES INVOLVED

In order to be able to run **GPA** and/or **peakmaker** from Matlab, the following files must be copied to a directory included in the Matlab path:

peakmaker.m	Matlab program for the visual initial estimation of pure voltammograms.
gpa.m	Matlab program for the fitting of experimental data matrices by means of GPA
gpacalc1.m gpacalc2.m negtozero.m	set of Matlab programs which are used by gpa.m

SAMPLE DATA

The workspace Matlab files **sample.mat** and **sample2.mat** contain simulated data to practise some aspects of the GPA procedure according to the present tutorial.

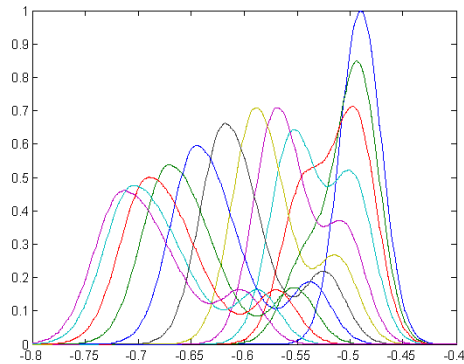
ANALYSIS OF SAMPLE DATA

When you load the file **sample.mat** in Matlab you can find the following matrices:

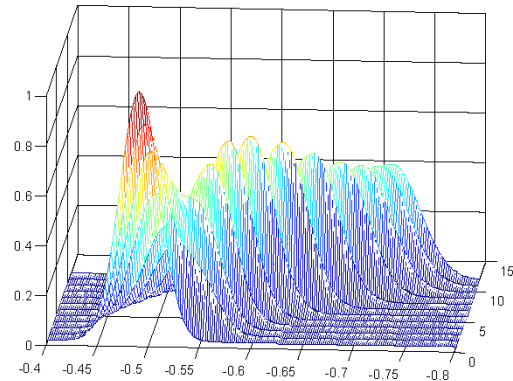
I	(200 rows, 12 columns)	current data matrix including 12 voltammograms simulated for 200 potential values
E	(200 rows, 1 column)	column vector with the potential values
n	(12 rows, 1 column)	column vector with the number of the voltammograms

You can look at the data matrix in both 2D and 3D ways by means of the commands

plot (E, I)



mesh (n, E, I)



Before starting the analysis of the **I** matrix, it is necessary to provide a reference pure signal for every component. This can be done in many ways. In the sample file, the reference signal matrix **esv** has been obtained from the visual inspection of the experimental matrix using the **peakmaker** program. This program can be invoked in the way:

```
esv=peakmaker(I);
```

Then, you get the mask:

```
INITIAL ESTIMATION OF PEAK-SHAPED FUNCTIONS
```

```
How many peaks per species?
```

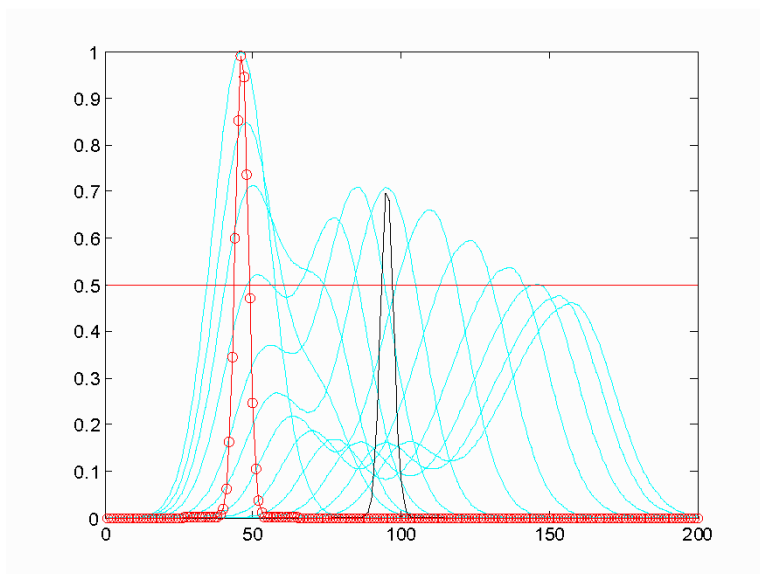
You have to answer 1 (and press enter), unless you have a component defined as a double peak, which is not usual

Later, you are asked about the symmetry of the peak (1 for symmetric, 0 for asymmetric) and after selecting it you get the message:

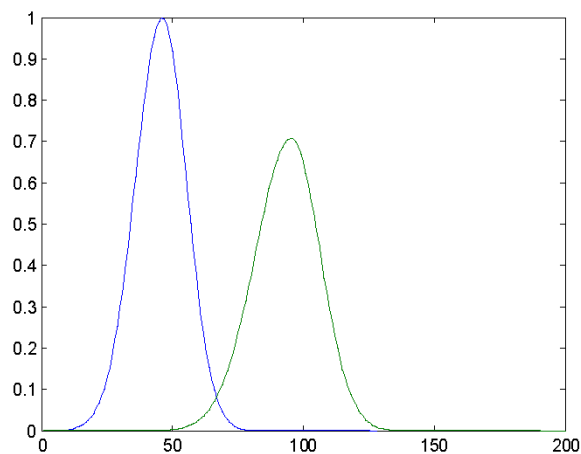
```
Symmetric peak? yes (1), no (0) 1
```

```
Select maxima of the peaks  
with mouse and press enter
```

Simultaneously, you get a Figure with a cyan 2D plot of the experimental matrix. Then, you have to click with mouse the top of every component you want to consider, which defines both height and position of the peaks. Until you finish you will not see any change in the plot. When you have completed the selection, just press enter and a first estimation of all peaks will be displayed over imposed to the cyan-coloured plot of the matrix. In the case of the sample data, 2 components should be defined, which produces a graph like this (it can change, depending on where you arbitrarily choose the position and the height of the peaks, and the best is to try in these parts of the experiment where the peaks are less overlapping to other signals, but not too far from the region where they appear for the first time):



In this graph, peaks are shown in black, except for the first one, which is red and denotes the experimental points with circles. A horizontal line is drawn at the half height of the peak. Then you have to select with mouse the x-axis position where you expect the peak to cross such line. In this way you are selecting the width of the symmetric peak, which is plotted now in black, while the red colour and the circles move to the next peak in order to repeat the same operation. If you are working with asymmetric peaks (i.e., you have selected this option in the beginning of the program) you have to click twice around every peak, to define the left and right boundaries and, hence, the asymmetry). At the end of the process, you should obtain an **esv** matrix similar to that provided in the file (with 200 rows and 2 columns):



Besides the **esv** matrix, to run ... it is necessary to provide some information inside the **isshift** matrix. In the sample file, the elements of **isshift** are:

```

1      1
0      1
1      2
12     12
    
```

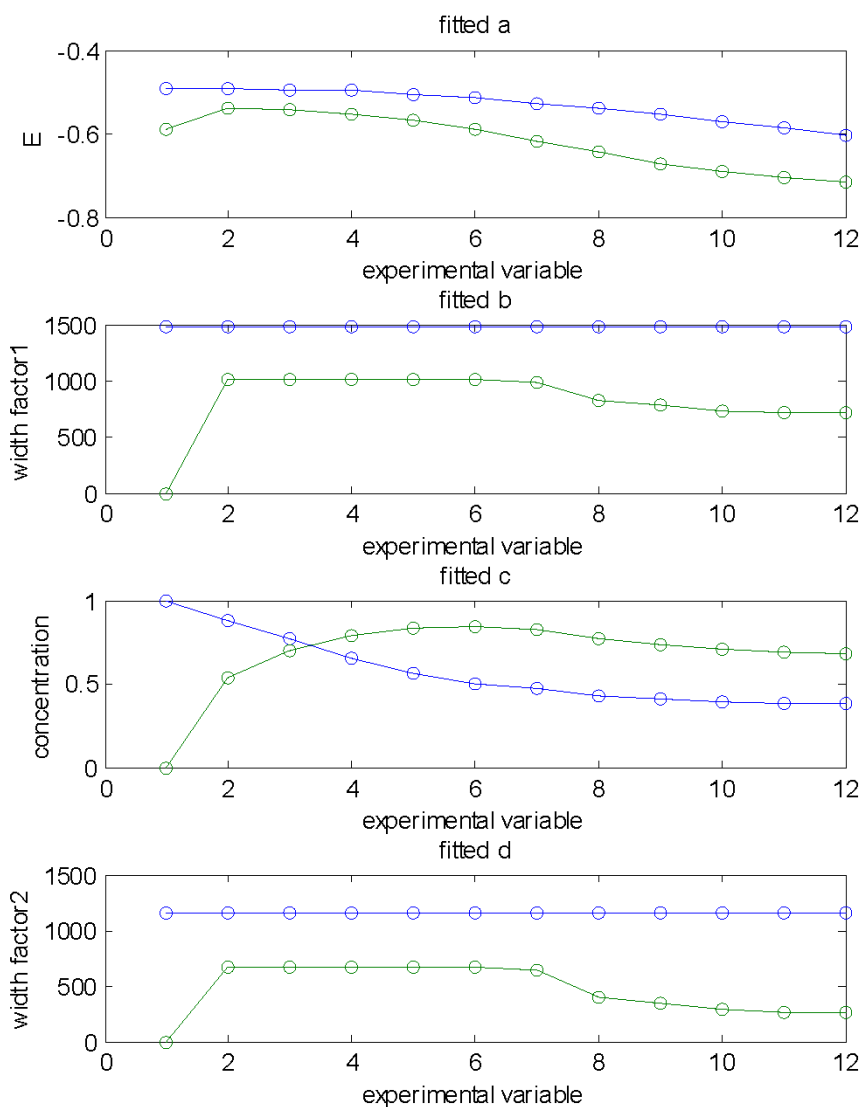
The first row indicates the movement of every peak (the two ones mean that both peaks move) and the second row indicates if there is any variation of peak width ("0" and "1" indicate that the first component has a fixed width and the second not). Inside the column

corresponding to each component, the third and fourth rows define the existence range (i.e., the scan numbers when the peak appears and disappears). For instance, component 2 appears in voltammogram number 2 and exists until voltammogram 12. The numbers in the last two rows have to be deduced by a careful inspection of the data matrix, voltammogram by voltammogram.

Once **esv** and **isshift** are ready, **gpa** program can be launched with the command:

```
[Epeak,Wpeak,Irep,Icor,a,b,c,d,C,Apeak]=gpa(I,esv,E,issift,n);
```

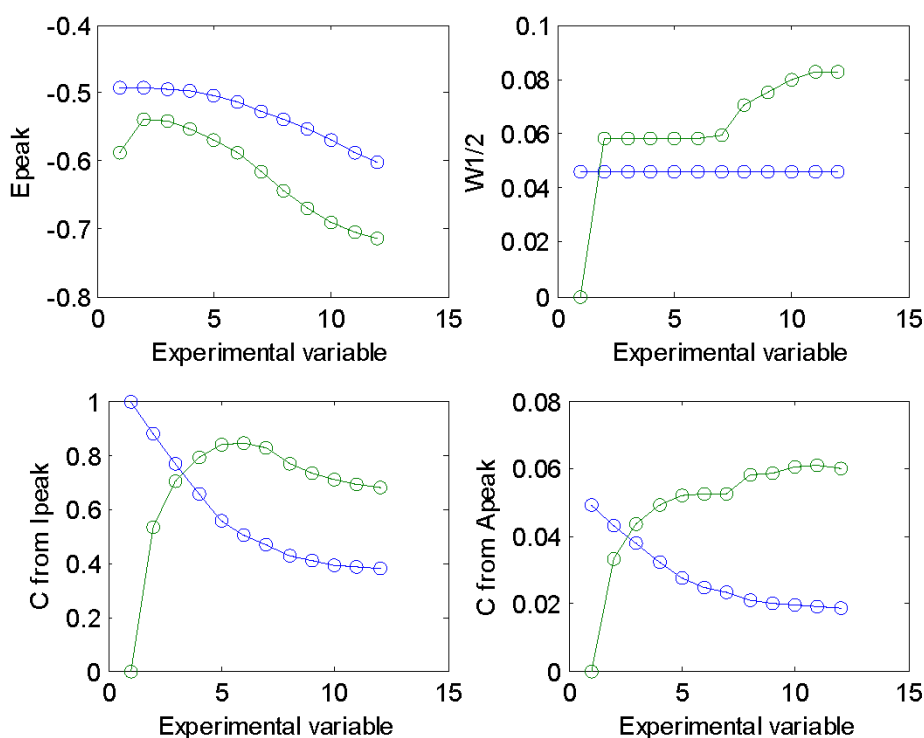
After executing, a figure shows for each component (1st in blue and 2nd in green) the optimised a,b,c,d parameters as functions of the experimental variable (n in our case):



After you press a key, the lack of fit appears:

```
lack of fit (%) :
1.9641
```

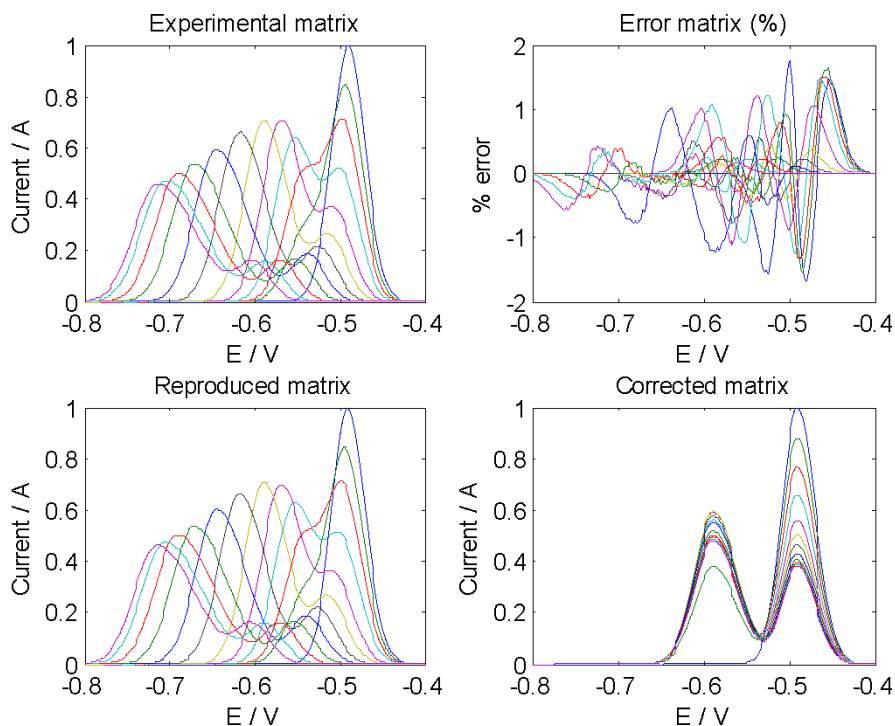
After pressing a key again, a new graph appears with the analytical parameters computed from the optimised values of a,b,c,d. These are the peak potential, the half peak width and the concentration profiles from both peak height and peak area:



Later, the program asks if you want to compute the concentration profiles from peak currents or peak areas. Then select the right number (e.g. 1) and press enter

```
Do you want to estimate concentration profiles
from peak currents (1) or from peak areas (2)?
```

Then, you get a graph which compares the experimental (**I**) and reproduced (**I_{rep}**) matrices and also shows the error matrix and the corrected matrix (**I_{cor}**, that which would be observed if all peaks would keep the same position and width as the reference signals in **esv** matrix along all the experimental run).



The program generates the following matrices:

Epeak (12 x 2):	peak potential for every component
Wpeak (12 x 2):	half peak width for every component
Irep (12 x 200):	reproduced matrix
Icor (12 x 200):	matrix corrected for potential shifts
a (12 x 2):	fitted "a" values for each component at each voltammogram
b (12 x 2):	fitted "b" values for each component at each voltammogram
c (12 x 2):	fitted "c" values for each component at each voltammogram
d (12 x 2):	fitted "d" values for each component at each voltammogram
C (12 x 2):	concentration profiles for every component
Apeak (12 x 2):	peak potential E for every component

In **sample2.mat** file you have all these matrices as computed in the present tutorial. You should not get very different values unless you select initial values or restrictions (**esv**, **isshift**) very different from these employed here.

In **sample2.mat** there are also **csel** and **isshift1** matrices. This new **isshift** does not correspond to the true existing ranges of the components, but **csel** does. The result is the same that if realistic **isshift** was used. This shows that **csel** matrix prevails in front of existence ranges in **isshift**.

8.3. Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment: implementation of 2D transversal constraints and its application for the determination of pKa and complexation constants by differential pulse voltammetry.

Santiago Cavanillas, Núria Serrano, José Manuel Díaz-Cruz, Cristina Ariño,
Miquel Esteban.

Analyst 138 (2013) 2171–2180.

Cite this: *Analyst*, 2013, **138**, 2171

Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment: implementation of 2D transversal constraints and its application for the determination of pK_a and complexation constants by differential pulse voltammetry†

Santiago Cavanillas, Núria Serrano, José Manuel Díaz-Cruz,* Cristina Ariño and Miquel Esteban

A new method, GPA2D, is presented as a significant improvement of the previously described Gaussian Peak Adjustment (GPA) which includes, for the first time, transversal constraints to increase the consistency of the resolution along the different signals of a voltammetric dataset. The constraints deal with the evolution of peak potentials *versus* pH and with the implementation of chemical equilibrium constants. Moreover, *pkavolt*, a new tool for the pK_a determination, is proposed as an example of the great versatility of the PSF-GPA (Parametric Signal Fitting by Gaussian Peak Adjustment) methodology. GPA2D and *pkavolt* have been successfully tested on the systems Cd(II):phytochelatin, Cu(II):6-benzylaminopurine, Cd(II):1,10-phenanthroline, Zn(II):oxalate and captopril drug by determining formation constants (metal complex systems) or pK_a values (captopril).

Received 12th June 2012
Accepted 1st February 2013

DOI: 10.1039/c3an35790b

www.rsc.org/analyst

1 Introduction

Voltammetric measurements of metals involved in complexation equilibria are able to distinguish the different forms of the metal ion to provide a complexation scheme. In simple systems the results are computed by adjusting the parameters of the equations of an established and well-known physicochemical model to the experimentally obtained signals (hard modelling). However, the usual overlapping of the signals and the complexity of the systems make it necessary to use chemometric techniques for the correct interpretation of the results (soft modelling), which are widely applied in the field of electroanalysis.^{1–3}

The application of the Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares (MCR-ALS) method⁴ for the soft modelling treatment of the electroanalytical data has been described elsewhere.⁵ It provides the concentration profile of each component and the corresponding pure response. The information yielded is very useful to understand the electrochemical behavior of the studied systems. The application of this method to the voltammetric data requires that: (i) the

currents have to be measured at the same potentials; and (ii) the currents have to linearly depend on the concentrations of every electroactive species. However, in many electrochemical processes this last requirement is compromised and it makes the application of MCR-ALS analysis difficult. Such non-linearity can be attributed to the presence of voltammetric signals that progressively get broader or narrower and/or move along the potential axis. Among other reasons, losses of electrochemical reversibility would be responsible for this behavior.

In order to solve the problem of lack of linearity during the voltammetric measurements some chemometric tools were developed. For example, the *shiftfit* algorithm corrects the data matrix from signal movements as a previous treatment to MCR-ALS analysis,^{6,7} and *pHfit* can solve more intricate systems by imposing a shape-restriction to the movements of the signals as a function of potential.⁸

Recently, Parametric Signal Fitting (PSF) was proposed as a new strategy for the chemometric study of peak-shaped voltammetric signals which do not behave in a linear way. It is based on the description of the signals by means of parametric functions whose parameters are least-squares adjusted to the experimental data and can be used to monitor the evolution of significant variables (peak potentials, currents, concentrations...) along the experiments. A first approach in this direction was the algorithm termed as Gaussian Peak Adjustment (GPA), which fits two Gaussian functions, one at each side of every peak-shaped signal.⁹ The fitted parameters

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, 1-11, E - 08028 - Barcelona, Spain. E-mail: josemanuel.diaz@ub.edu; Fax: +34 93 402 12 33; Tel: +34 93 403 91 16

† Electronic supplementary information (ESI) available. See DOI: 10.1039/c3an35790b

are directly related to the height, position, width and symmetry of the peaks. GPA was successfully applied to the study of different complexation systems.^{10–13} Furthermore, a more sophisticated function (asymmetric logistic peak) was implemented to the PSF methodology to deal with highly asymmetric signals.¹⁴

Nevertheless, the advantage of PSF methodology is compromised by the lack of a clear link between the successive voltammograms of an experimental dataset, which are fitted independently (except for the fact that the parameters optimised for every voltammogram are used as initial estimations in the fitting of the next one). Thus, it would be necessary for the implementation of transversal constraints to lead the behavior of the signals throughout the different voltammograms and enhance the physicochemical sense of the results, as it happens with the forced sigmoid evolution of the peak potentials with pH in *pHfit* or with the implementation of adjustable stability constants in MCR-ALS.^{8,15}

To solve these drawbacks, in the present work several transversal constraints are developed and implemented in a new program, GPA2D, based on the PSF-GPA method. GPA2D takes advantage of the relationship of the parameters with some characteristics of the peak, such as the height, position or width, to adjust these parameters to chemical equations (complexation equilibria) for the study of metal complexation and pH titrations (where the signals shift along the experiments because of the involvement of protons in the reduction processes).

The aim of GPA2D is focused on: (i) the adjustment of complexation constants to the concentration profiles for different metal–ligand systems; and (ii) the adjustment of the movement of the signals during a pH titration to a lineal or sigmoidal dependence. Moreover, a complementary tool, *pKa-volt*, which allows the determination of pK_a values from a set of voltammetric experimental data, is implemented and presented in this paper. This application is also based on the PSF-GPA method, and it shows the great possibilities and the versatility of this method.

Table 1 summarises the features of the newly developed method as compared to the existing ones and Fig. 1 shows the main structure of the operation program, which is based on a common GPA procedure with two alternative intermediate paths depending on the kind of transversal constraint to be applied (signal shift evolution or equilibrium).

2 Theory

2.1 Gaussian Peak Adjustment (GPA)

Differential pulse voltammetric signals can be described by Gaussian peaks allowing the application of the PSF-GPA method. This program requires a data matrix (\mathbf{I}) arranged with as many rows as the number of recorded voltammograms and as many columns as potentials scanned during the current measurements. From a set of reference signals (*esv*) defined for every component, and according to a constraint matrix (*isshift*) that restricts the type of movements, the broadening and the existence range of the peaks, the GPA algorithm fits a couple of Gaussian functions to each peak-shaped signal:⁹

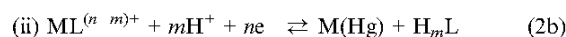
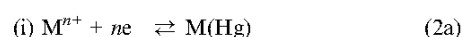
$$I_{\text{right}} = c \exp\{-d(E - a)^2\} \quad (1a)$$

$$I_{\text{left}} = c \exp\{-b(E - a)^2\} \quad (1b)$$

where ' c ' is the peak height, ' a ' is the peak potential and ' b, d ' are the half peak widths at both sides of the peak. It must be remarked that the concept of "component" in electrochemical data in MCR-ALS or GPA refers to the signal from an electrochemical process, and not to a chemical species, as in spectroscopic data. Thus, in the complexes containing one electroactive site (*e.g.*, one metal), one component is associated with the process and also to the species. However, 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.

2.2 Shift constraint for pH titrations

When a metal M is reversibly reduced at a mercury electrode and reacts with a ligand L to form electrochemically active and inert complexes (*i.e.*, which do not dissociate during the measurement), separated signals are observed for the free metal and the complex, according to the processes:^{16,17}



If protonation equilibria are involved in the electrochemical reduction of the complex (eqn (2b)), a strong dependence of the corresponding peak potential on pH is observed. Despite the

Table 1 Comparison of the main characteristics of the proposed method with those of previous approaches

Method	MCR-ALS (unconstrained)	MCR-ALS (signal shape- constrained)	MCR-ALS (equilibrium- constrained)	shiftfit	pHfit	GPA	GPA2D
Reference	4,5	5	15	6,7	8	9	This work
Applicable to bilinear data?	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
Applicable to non-bilinear data?	No	No	No	Yes	Yes	Yes	Yes
Signal described by parametric equation?	No	Yes	No	No	No	Yes	Yes
Parametric evolution of:							
Concentrations	No	No	Yes	No	No	No	Yes
Pure signals	No	No	No	No	Yes	No	Yes

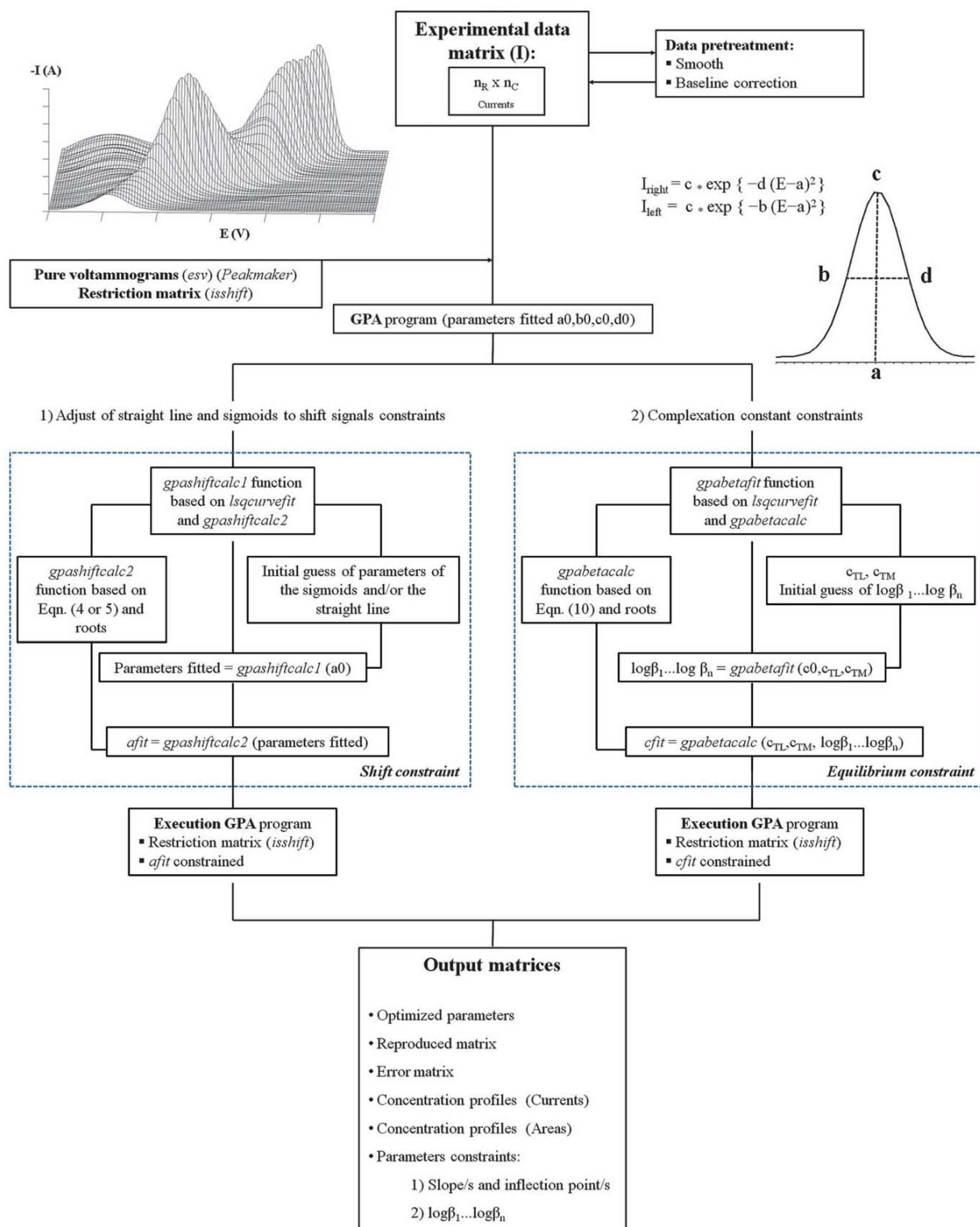


Fig. 1 Flowchart of the operation program.

inherent complexity of the problem, a good approach is reached by writing the Nernst equation of reaction (ii):

$$E = E^{\circ'} + \frac{0.058}{n} \log \frac{[\text{H}_m\text{L}]}{[\text{ML}^{(n-m)+}][\text{H}^+]^m} \quad (3)$$

assuming the value of 0.058 at 20 °C and $E^{\circ'}$ as the formal potential. The reorganization of eqn (3) suggests a linear relationship between the peak potential of the signal (E_p) and pH:

$$E_p = k - 0.058 \frac{m}{n} \text{pH} \quad (4)$$

The slope of the linear plot of E_p versus pH provides us with the relationship between the protons and the electrons exchanged in the electrochemical reduction of the complex. For electrochemically irreversible signals some authors propose the substitution of n in eqn (4) by the product αn , where α is the transfer coefficient of the electrochemical process.¹⁸ Moreover, the situation depends on the distribution of the differently protonated species of the free ligand. Taking into account these considerations and the experimental evidence that many ΔE versus pH plots show a sigmoid evolution, a parametric equation was proposed to describe such evolution, which constitutes the basis of the *pHfit* method:⁸

$$\Delta E = \frac{a_s}{1 + e^{b_s(\text{pH} - c_s)}} + d_s \quad (5)$$

There a_s , b_s , c_s , and d_s are adjustable parameters: a_s is the limiting height of the sigmoid; b_s is related to the slope in the region close to the inflexion point; c_s is the pH of the inflexion point; and d_s is the vertical displacement of the sigmoid from the zero baseline. In the vicinity of the inflexion point, the sigmoid can be approached by a straight line (as is assumed in eqn (5)), whose slope (*i.e.*, the maximum slope of the sigmoid) is given by:

$$\text{max. slope} = -\frac{a_s b_s}{4} \quad (6)$$

The program also considers signals which do not change with pH and signals whose peak potential linearly moves with pH. As Table 1 shows, *pHfit* does not use a parametric function for describing pure signals. Instead, a fixed voltammogram (estimated with peak shaped signals or experimental voltammograms in the absence of the other components) is shifted an adjustable ΔE value as a function of pH by using eqn (5).

GPA2D was developed with the aim to allow the analysis of systems with a linear or sigmoidal evolution of ΔE versus pH plots by adapting the *pHfit* transversal constraint along different voltammogram/pH values to the longitudinal double Gaussian constraint of every peak according to GPA.

As it has been said before, Fig. 1 summarizes how GPA2D works. First, the kind of movement of every component with pH has to be indicated in the first row of a restriction matrix *isshift*, by means of the numbers 0 (no movement), 1 (linear) or 2 (sigmoid). Depending on the introduced value, the GPA2D program makes an estimation of the shift of each component (parameter a , E_{peak}). Next, the subroutine *gpashiftcalc1* optimizes the parameters of the sigmoid or straight line by

least-squares. From these calculated parameters, the subroutine *gpashiftcalc2* computes the newly shifted parameters (a , E_{peak}) for each component. Finally, the GPA algorithm is executed with its restriction matrix (*isshift*), together with the obtained parameter a .

The outputs are the optimized parameters, both reproduced and error matrices, the relative concentration profiles (from currents or areas), and the sigmoid or linear descriptors that provide information about the complexation system.

2.3 Equilibrium constraint

A chemical equilibrium constraint has been implemented in GPA2D in a similar way as it was made for MCR-ALS in the case of successive and mononuclear metal complexes.¹⁵ For calculating the stability constants the program requires the assumption of a complexation model (the number and stoichiometries of the metal complexes and some initial estimation of the stability constants). Then, it takes advantage of the current fitted in a first approach by GPA by means of the subroutines *gpabetafit* and *gpabetacalc*, based on the MATLAB optimization function *lsqcurvefit*.

The calculation of chemical equilibrium requires the resolution of the polynomial equation that results from the combination of the overall formation constants and the mass balance for the metal and the ligand:

$$\beta_1 = [\text{ML}]/([\text{M}][\text{L}]), \dots, \beta_n = [\text{ML}_n]/([\text{M}][\text{L}]^n) \quad (7)$$

$$c_{\text{TM}} = [\text{M}] + [\text{ML}] + \dots + [\text{ML}_n] \quad (8)$$

$$c_{\text{TL}} = [\text{L}] + [\text{ML}] + \dots + n[\text{ML}_n] \quad (9)$$

where β_1, \dots, β_n are the overall formation constants of the complexes $\text{ML}, \dots, \text{ML}_n$ and c_{TM} and c_{TL} are the total concentrations of the metal and the ligand species, respectively. The combination of these previous equations as a function of the free ligand concentration $[\text{L}]$ produces:¹⁵

$$[\text{L}]^{n+1}\beta_n + [\text{L}]^n\{\beta(nc_{\text{TM}} - c_{\text{TL}}) + \beta_{n-1}\} + [\text{L}]^{n-1} \times \{\beta_{n-1}((n-1)c_{\text{TM}} - c_{\text{TL}}) + \beta_{n-2}\} + \dots - c_{\text{TL}} = 0 \quad (10)$$

where n indicates the maximum number of successive monometallic complexes formed. Once $[\text{L}]$ is known, the equilibria of concentrations of the remaining species are computed from the combination of eqn (7)–(9) yielding:

$$[\text{M}] = 1/(1 + \beta_1[\text{L}] + \beta_2[\text{L}]^2 + \dots + \beta_n[\text{L}]^n) \quad (11)$$

$$[\text{ML}_n] = \beta_n[\text{L}]^n/(1 + \beta_1[\text{L}] + \beta_2[\text{L}]^2 + \dots + \beta_n[\text{L}]^n) \quad (12)$$

In the optimization procedures (summarized in Fig. 1) firstly, from a set of concentrations (parameter c) of the different metal species fitted by GPA and the corresponding c_{TM} and c_{TL} values, a set of log β values are optimized by *gpabetafit* by least-squares. From these calculated log β values, new normalized concentration profiles are fitted by *gpabetacalc*. These data are adapted to the normalization of parameter c by GPA, which is

executed with its restriction matrix (*isshift*) together with the obtained parameter c .

The outputs are the optimized parameters, both reproduced and error matrices, the relative concentration profiles (by currents or areas), $\log \beta$ calculated and the concentration of the fitted species.

It must be remarked that the optimization of $\log \beta$ can be carried out in two ways: from the concentration profiles of the metal and complexes or only from the free metal concentration.

2.4 pK_a versus pH

Dissociation constants can be determined by several classical methods: UV-spectroscopy, potentiometry, conductometry, electrophoresis or voltammetry.¹⁹ Particularly, voltammetric techniques such as linear sweep voltammetry, differential pulse voltammetry and more recently elimination voltammetry with linear scan were used for computing pK_a of different types of compounds with a very good agreement between the pK_a values obtained by different methods.^{20,21}

The dependence between the peak potential (E_p) of the electrochemical reduction of protonated and deprotonated forms of a compound and pH is given by eqn (4). As it was described in previous works, a slope change is visible in the dependence of E_p on pH in the vicinity of $pH = pK_a$.

pkavolt is a new chemometric tool also based on PSF-GPA for the determination of pK_a . In order to compute the pK_a values, *pkavolt* uses the fitted parameters of the signals. The most important requirements of the program are that the substance has to be electrochemically active and its behaviour has to follow eqn (4) in all the pH ranges.

3 Experimental

3.1 Chemicals and instrumentation

Zn(II), Cd(II) and Cu(II) 0.01 mol L⁻¹ stock solutions were prepared from Zn(NO₃)₂·4H₂O, Cd(NO₃)₂·4H₂O and Cu(NO₃)₂·3H₂O (Merck, analytical grade) standardized by complexometric titration. A stock solution of 6-benzylaminopurine (BAP) (Aldrich, ≥99.0%) was prepared from the solid product solubilized in ethanol (Panreac, p.a.). Solutions of 1,10-phenanthroline (Merck, analytical grade), phytochelatin PC₂ ((γ-Glu-Cys)₂-Gly as trifluoroacetate salt) (DiverDrugs S.L., with purity of 91.8% – HPLC-MS), captopril ((S)-1-(3-mercapto-2-methyl-1-oxopropyl)-L-proline) (Fluka, HPLC grade), and potassium oxalate (Carlo Erba, pure reagent grade) were prepared by dissolving the reagents in water. HNO₃ and KOH solutions were prepared from Titrisol (Merck) and diluted to obtain solutions of the required concentration. Acetic acid/acetate buffer is prepared at pH 5 and 0.1 mol L⁻¹ KNO₃ ionic strength. Britton–Robinson buffer is adjusted at pH 5.1 and 0.1 mol L⁻¹ NaClO₄·H₂O ionic strength. Ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 water purification system) was employed in all experiments.

Voltammetric measurements were performed using a Metrohm-757 VA Computrace (Metrohm, Switzerland) 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 mm², Ag/AgCl, KCl (3 mol L⁻¹), and glassy carbon respectively, all of them from Metrohm. Double distilled Hg was used. Unless otherwise indicated, the instrumental parameters for the experiments were a drop time of 1 s, a scan rate of 0.005 V s⁻¹, a pulse time of 0.05 s, and a pulse amplitude of 0.05 V. pH measurements were made with an Orion SA 720 pH meter. All the experiments were carried out at 25 °C and purified nitrogen (Linde 50) was used for solution deaeration.

3.2 Procedures

Complexation measurements of Zn(II):oxalate, Cu(II):BAP, and Cd(II):1,10-phenanthroline systems were done according to previous experiments.^{9,13,15} Voltammetric measurements of pH titrations (from pH 2.5 to 10) of PC₂ and the Cd(II):PC₂ systems were respectively done following published procedures.⁸ The determination of pK_a values was done in captopril drug solution in Britton–Robinson buffer adjusted to 0.1 mol L⁻¹ ionic strength by adding KNO₃ for pH values ranging from 1.7 to 11.8 and 25 °C. Solutions were deaerated with nitrogen and a scan by differential pulse polarography (DPP) was recorded.

3.3 Data treatment

Experimental matrices have been analysed by using a set of homemade Matlab programs available as ESI of this work and in the address http://www.ub.edu/dqaelc/programas_eng.html.

4 Results and discussion

4.1 GPA2D

The aim of GPA2D is to extract a physicochemical sense to the evolution of the signals and their shifts along the experimental axis. The imposition of the transversal constraints makes this method more powerful for the analysis of voltammetric data, especially if they are non-bilinear.

4.1.1 Signals-shift constraint. The complexation of phytochelatins (PC_n) with several heavy metals has been widely studied in the last few years by our group. In this context, *pHfit* was the first program able to adjust different equations to reproduce the potential shifts of the signals, and it was successfully tested with the Cd(II):PC₂ system.⁸ Although *pHfit* provides an acceptable resolution of the system, the lack of fit is considerable since the voltammetric signals not only undergo a potential shift during the pH titration but they also have important changes in the peak shape. The new program GPA2D permits the application of the transversal shift constraints of PSF-GPA but modified by the peak-shaped restriction, which solves the limitations of the *pHfit* program, thus providing good results with a lower lack of fit.

Fig. 2 shows a typical example of the application of GPA2D. The behaviour of the 1 : 2 Cd(II) : PC₂ system is rather complicated, with many overlapping signals which shift through the potential axis along the pH titration (Fig. 2a). The program was executed in the shift constraint mode, which fits the initial parameters of each component (including peak potentials,

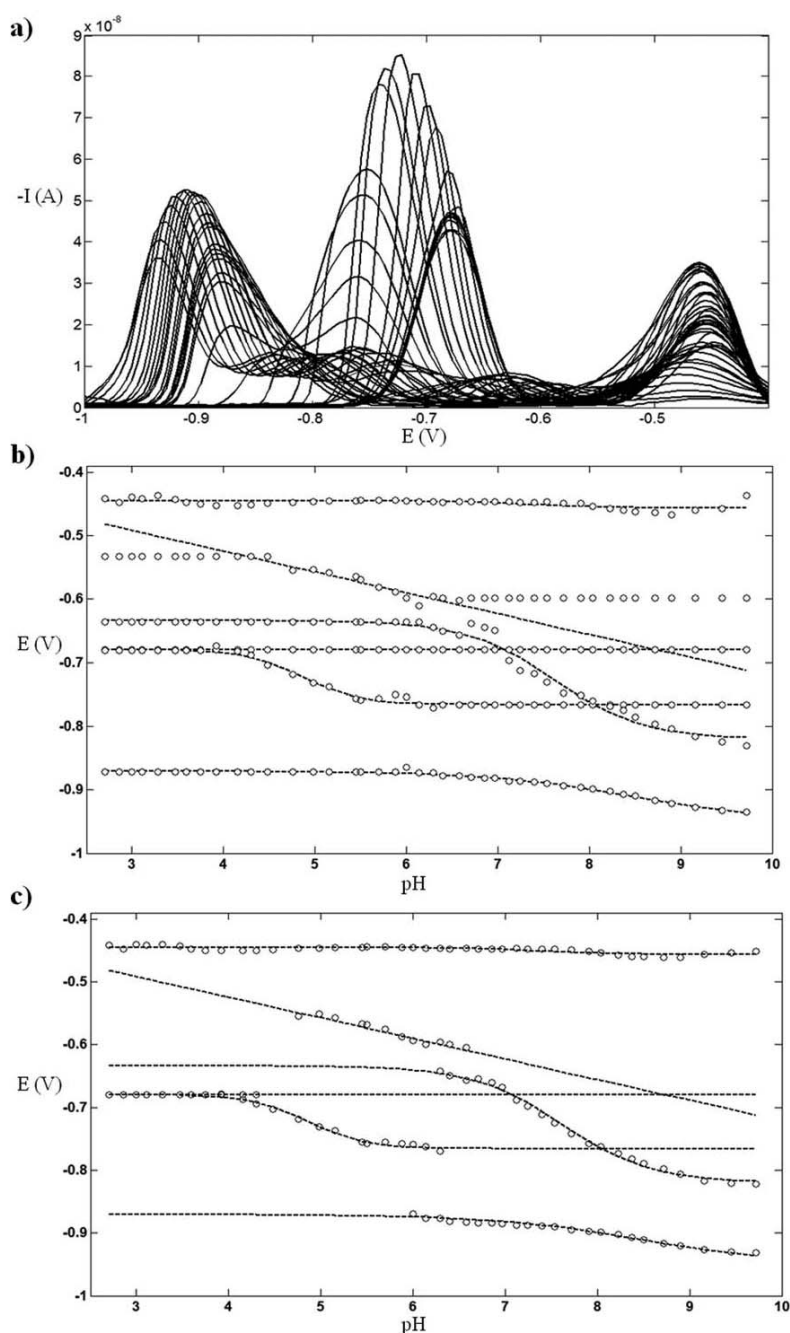


Fig. 2 (a) Experimental data matrix (current vs. potential) obtained in the DPP pH titration of the 1 : 2 Cd(II) : PC₂ system in 0.1 mol L⁻¹ KNO₃. (b) Plot of the initial estimations of E_{peak} (O) of each component and the optimized functions (–) by GPA2D. (c) Plot of the adjusted E_{peak} (O) to the optimized functions (–).

Fig. 2b (O)). Further, the program extracts from the restriction matrix (*isshift*) the type of movements needed to adjust for each component, and GPA2D calculates and shows (Fig. 2b (–)) the optimized functions (straight line or sigmoid) from the fitted parameters by least squares. Finally, the new peak potentials (Fig. 2c (O)), the optimized functions and the lack of fit are provided. To summarize, the outputs of the program are: the error matrix, the reproduced matrix, the peak potentials of each

component, the concentration profiles from currents, and the concentration profiles from areas.

Table 2 compares the results obtained by GPA2D and *pHfit* when analyzing the DPP pH titrations of PC₂ and 1 : 2 Cd(II) : PC₂ systems. In both cases the lack of fit obtained with GPA2D is much lower than this by *pHfit* and this suggests that the fitted parameters by GPA2D (not very different) should be more accurate.

Table 2 Comparison of GPA2D and *pHfit* for the analysis of DPP pH titrations of PC₂ and 1 : 2 Cd(II)–PC₂ systems

Component	Type of adjustment	Parameter	GPA2D		<i>pHfit</i> ⁸	
			PC ₂	1 : 2 Cd(II) : PC ₂	PC ₂	1 : 2 Cd(II) : PC ₂
1	Not move		—	—	—	—
2	Straight line	Slope	—	0.040	—	0.042
3	Not move		—	—	—	—
4	Sigmoid	Slope	0.064	0.086	0.070	0.057
		Inflexion point	4.40	4.86	4.44	4.90
5	Sigmoid	Slope	0.042	0.082	0.053	0.044
		Inflexion point	9.02	8.48	8.60	8.94
6	Sigmoid	Slope	—	0.018	—	0.028
		Inflexion point	—	7.60	—	8.15
		Lack of fit (%)	3.61	8.24	12.6	15.6

4.1.2 Equilibrium constraint. For testing the performance of the equilibrium constraint implemented in GPA2D, the determination of the complexation constants of different systems and the comparison with the values collected in the bibliography were carried out. The equilibrium equations were adjusted to the data taking the complexation constants optimized by the program as a constraint, which leads to the evolution of the signal along the experimental axis. The evaluated systems present different behaviors with respect to the evolution and the overlapping of the signals of the metal and its complexes. GPA2D was applied to the systems adjusting different restrictions related to the movement, the broadening, and the selectivity of the signal of the complexes and/or the metal. This allows us to check the robustness of the method and to calculate the standard deviation between the different adjustments.

One of the selected systems was Cu(II):BAP, which is interesting because the application of GPA2D with this equilibrium constraint allowed, for the first time, the determination of its complexation constants by electroanalytical techniques. Fig. 3a shows the experimental data of the BAP to Cu(II) titration, where the free metal ion presents a signal (component 1) that is independent of the signals of the two complexes. The extreme overlapping of these complexes and the continuous shift to

more negative potentials were caused by the formation of two consecutive complexes and the adsorption of the free BAP. These behaviors caused a dramatic loss of linearity that was studied and solved by GPA.¹³ The first complex (component 2) exhibits a great reversibility while the second complex (component 3) seems more irreversible.

The program was executed in the equilibrium constraint mode, in which the initial parameters of each component (including the concentration profiles, Fig. 3b (—)) were fitted and the initial estimation of the complexation constants were introduced into the program. GPA2D calculated and displayed the adjusted complexation constants to the data, and the concentration profiles were optimized from the obtained complexation constants. The new concentration profiles (Fig. 3b (···)) and the lack of fit are provided. To summarize, the outputs of the program are: the error matrix (Fig. 4b); the reproduced matrix (Fig. 4c); the peak potentials of each component (Fig. 4d); the concentration profiles from currents (Fig. 4e); the concentration profiles from areas (Fig. 4f); and the absolute concentrations (Fig. 4g) calculated by the total metal concentration (c_{TM}).

The complexation constants of the Cu(II):BAP system were computed by two different approaches: (i) the behaviors of

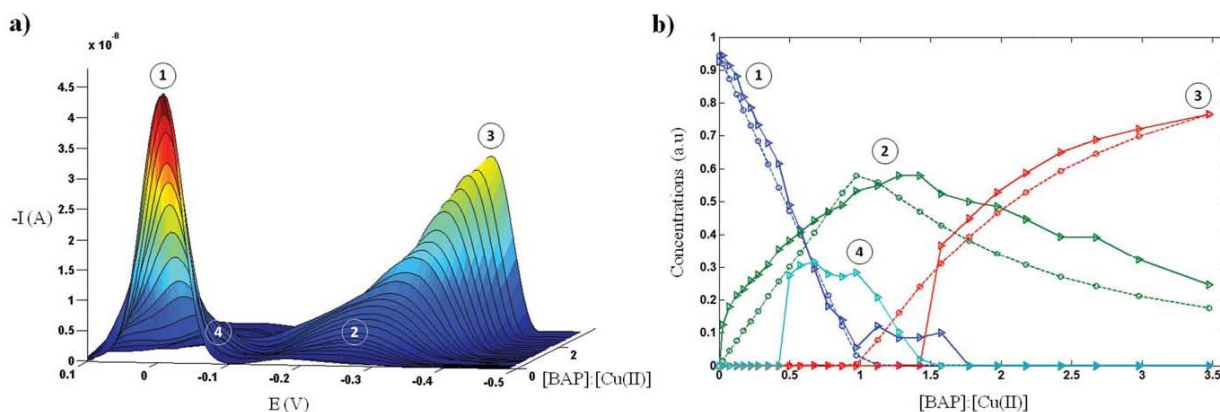


Fig. 3 (a) Experimental data matrix (current vs. potential vs. concentration ratio) obtained in the DPP titration of Cu(II) solution with BAP at pH 5.1 and 0.1 mol L⁻¹ NaClO₄ of ionic strength. (b) Estimation of the concentration profiles (—) and the new concentration profiles (···) adjusted to the optimized complexation constants by GPA2D. Components: 1 – free Cu²⁺ ion; 2 – Cu(BAP) complex; 3 – Cu(BAP)₂ complex; and 4 – anodic signal.

Table 3 Stability constants obtained by GPA2D for the studied systems and comparison with some literature data

Titration	Fitting mode	Technique	Ion strength (M)	Log β_1	Log β_2	Log β_3	Lack of fit (%)
BAP to Cu(II)	M and ML_n	DPP	0.1	8.6 ± 0.1	14.0 ± 0.5		11.23
BAP to Cu(II)	Only M	DPP	0.1	8.2 ± 0.3	13.9 ± 0.3		8.11
BAP to Cu(II) ²²		UV-Vis	0.1	8.3	15.9		
1,10 Phenanthroline to Cd(II)	M and ML_n	DPP	0.1	5.7 ± 0.2	10.8 ± 0.3	15.2 ± 0.3	10.88
1,10 Phenanthroline to Cd(II)	Only M	DPP	0.1	4.7 ± 0.2	9.8 ± 0.1	16.3 ± 0.5	7.42
1,10 Phenanthroline to Cd(II) ¹⁵		DPP	0.1	5.64	10.95	15.95	
1,10 Phenanthroline to Cd(II) ²³		DPP	0.1	5.8	10.6	14.6	
Oxalate to Zn(II)	M and ML_n	DPP	0.16	3.8 ± 0.1	6.8 ± 0.2		8.23
Oxalate to Zn(II)	Only M	DPP	0.16	3.4 ± 0.1	6.5 ± 0.3		5.54
Oxalate to Zn(II) ²⁴		DPP	0.16	3.52	6.83		
Oxalate to Zn(II) ²⁵		DPP	0.16	3.88	6.40		

4.2 Application for the pK_a determination

The chemometric tool, *pkavolt*, for determining the pK_a values was tested with the drug captopril which has two pK_a values corresponding to the carboxylic and thiol groups. The tool was also based on PSF-GPA which takes advantage of the fitted parameters that explain each component, showing the great versatility of this method. To obtain the pK_a value, *pkavolt* adjusts two straight lines, with different slopes, to the experimental data and the intersection point between them provides the pK_a value according to eqn (4). In this way the determination of the pK_a values of the carboxylic and thiol groups were evaluated in the pH range from 2 to 7 and from 7 to 11 respectively.

The voltammetric experimental data (Fig. 5a) were analyzed and the program provides the peak potential of each component for each measurement by least squares (*E vs. pH* plot). The captopril system shows two overlapped peaks, which mean that two components have to be independently fitted and, for this reason, the reliable selected component has to be indicated. Then different slopes are revealed and the visual intersection point should be selected for the indicated component. Finally, the program optimizes by least squares the descriptor parameters corresponding to both straight lines and the pK_a value is computed (Fig. 5b). By applying this method to the captopril

drug, the values $pK_{a1} = 3.94$ and $pK_{a2} = 10.09$ were obtained (Table 4), which are in very good concordance with previous ones obtained by UV-Vis and potentiometry.^{26,27}

5 Conclusions

The implementation of transversal constraints in the GPA2D program (based on the PSF-GPA approach) has significantly improved the results of the existing methods (unconstrained GPA, *pHfit* and MCR-ALS) when applied to non-bilinear voltammetric datasets.

The first kind of constraint, *i.e.* signals-shift, has been successfully tested in the analysis of the Cd(II):PC₂ system. As compared to a previous *pHfit* analysis, it provides a better resolution with a lower lack of fit.

The second kind of constraint, *i.e.* chemical equilibrium, has been successfully tested with systems of well-known stability constants, obtaining a good agreement with the literature values. Additionally, the equilibrium mode of GPA2D has been applied to systems like Cu(II)-BAP, with scarce complexation data available, and has provided reliable electrochemical values for the stability constants which complement the older information by UV-Vis spectroscopy.

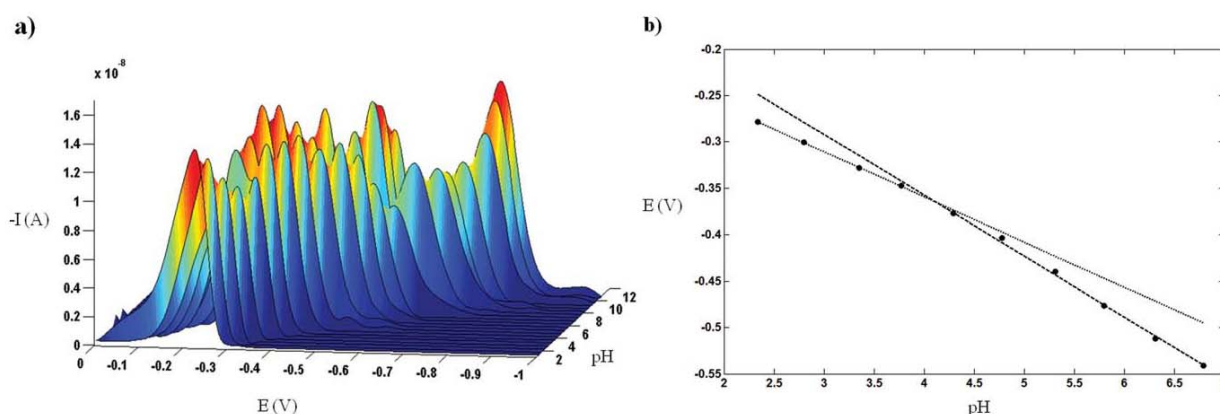


Fig. 5 (a) Experimental data matrix (current vs. potential vs. pH) obtained in the DPP pH titration of the captopril solution in $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ KNO}_3$. (b) Representation of the pH dependence of the voltammetric peak potential. The two straight lines have been optimized by *pkavolt*.

Table 4 The pK_a values of the captopril drug obtained by *pkavolt* and comparison with some literature data

Technique	Ion strength (M)	pK_{a1}	pK_{a2}
Polarography (DPP)	0.1	3.94 ± 0.07	10.1 ± 0.1
Uv-Vis ²⁶	0.1	3.90 ± 0.05	10.03 ± 0.08
Potentiometry ²⁷	0.5	3.7	9.8

Finally, the developed tool, *pkavolt*, for the determination of pK_a values, which takes advantage of the fitted Gaussian parameters, has been successfully applied in the computation of the pK_a values of the captopril drug.

Thus, these good results encourage the development and application of transversal constraints and tools inside the general PSF strategy.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471 and CTQ2012-32863). Santiago Cavanillas is grateful to MICINN for his Ph.D. grant (BES-2010-032352).

References

- M. del Valle, *Electroanalysis*, 2010, **22**, 1539–1555.
- Y. Ni and S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **626**, 130–146.
- M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 295–313.
- R. Tauler, A. K. Smilde and B. R. Kowalski, *J. Chemometr.*, 1995, **9**, 31.
- M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz and R. Tauler, *Trends Anal. Chem.*, 2000, **19**, 49–61.
- A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 112–125.
- A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 470–477.
- J. M. Díaz-Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2010, **135**, 1653–1662.
- S. Cavanillas, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **689**, 198–205.
- S. Cavanillas, R. Gusmão, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 309–315.
- C. Gilsanz, R. Gusmão, E. Chekmeneva, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 5988–5992.
- S. Cavanillas, E. Chekmeneva, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2012, **746**, 47–52.
- S. Cavanillas, A. Alberich, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2012, **137**, 5420–5427.
- M. Kooshki, J. M. Díaz-Cruz, H. Abdollahi, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2011, **136**, 4696–4703.
- J. M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban and R. Tauler, *Analyst*, 2001, **126**, 371–377.
- J. Koryta, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1959, **24**, 2903–2918.
- J. Koryta, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 1959, **24**, 3057–3073.
- D. R. Crow, *Polarography of metal complexes*, Academic Press, London, 1969, p. 34.
- A. E. Martell, R. J. Motekaitis, *Determination and use of stability constants*, VCH, New York, 1988.
- D. Tarkowska, M. Kotoucek and K. Dolezal, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 2003, **68**, 1076–1093.
- N. Serrano, S. Holubova and L. Trmkova, *Electroanalysis*, 2011, **23**, 2217–2225.
- I. Hideshi and H. Masaaki, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1986, **137**, 372–377.
- R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants: Other Organic Ligands*, Plenum Press, New York, 1975, vol. 2, p. 252.
- F. Berbel, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem.*, 1999, **475**, 99–106.
- R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants: Other Organic Ligands*, Plenum Press, New York, 1976, vol. 3, p. 94.
- A. Niazi and N. Ghasemi, *Ann. Chim.*, 2007, **97**, 845–858.
- P. R. da S. Ribeiro, A. O. Santini, H. R. Pezza and L. Pezza, *Ecletica Quím.*, 2003, **28**, 39–44.

8.4. Discusión de resultados

En estos dos trabajos se muestra la gran capacidad del algoritmo PSF-GPA. Esta nueva metodología se fundamenta en el ajuste paramétrico de señales, en concreto se ajustan dos funciones gaussianas, una a la izquierda y otra a la derecha de cada señal voltamperométrica. El método de optimización utilizado se basa en el algoritmo *lsqcurvefit* (Toolbox, Matlab) que consiste en la optimización de una ecuación o múltiples ecuaciones no lineales mediante un ajuste por mínimos cuadrados a través de los parámetros que definen las ecuaciones seleccionadas. Los parámetros que se optimizan en las ecuaciones están restringidos por unos valores mínimos y máximos preestablecidos. La función objetivo de este algoritmo es el sumatorio del cuadrado de las diferencias entre los valores experimentales y los reproducidos por el modelo.

PSF-GPA ajusta cada señal voltamperométrica de cada una de las medidas mediante la optimización de las siguientes ecuaciones:

$$I_{\text{left}} = c \exp(-b(E - a)^2) \quad \text{Ec. 8.1}$$

$$I_{\text{right}} = c \exp(-d(E - a)^2) \quad \text{Ec. 8.2}$$

donde la ecuación (8.1) es válida para valores de potencial (E) en que se cumple $E \leq a$. Por el contrario, la ecuación (8.2) es válida a valores $E \geq a$. Los parámetros ajustables a y c son comunes para ambas funciones gaussianas y determinan la posición y la altura del pico, respectivamente. En $E_{\text{peak}} = a$, ambas funciones convergen en un máximo, de manera que $I_{\text{left}} = I_{\text{right}} = c$. Los parámetros b y d son específicos de cada función y están relacionados con la anchura a cada lado de la señal, por lo que entre ambos se determina la anchura a media altura del pico ($w_{1/2}$). Por otro lado, la independencia del ajuste en ambos lados permite el análisis de posibles señales asimétricas. El ajuste de estos parámetros a una señal de pico gaussiana se ejemplariza en la Figura 24.

Las señales voltamperométricas son debidas a procesos electroquímicos, y estos pueden ser reversibles o irreversibles. En sistemas donde no varía el comportamiento electroquímico a lo largo del experimento, la altura de pico (parámetro c) es el mejor indicador para la determinación de la concentración de cada especie; no obstante, en sistemas donde hay cambios en la reversibilidad electroquímica, la concentración está mejor descrita si se consideran las áreas, ya que la relación entre la intensidad y la

concentración se ve comprometida. Debido a la necesidad de trabajar con las aéreas en sistemas no lineales, éstas se pueden calcular de manera directa a partir de los parámetros optimizados en ambas funciones que definen la geometría de la señal voltamperométrica. Para este cálculo la ecuación utilizada es:

$$\text{Area} = \frac{c\sqrt{\pi}}{2} \left(\frac{1}{\sqrt{b}} + \frac{1}{\sqrt{d}} \right) \quad \text{Ec 8.3}$$

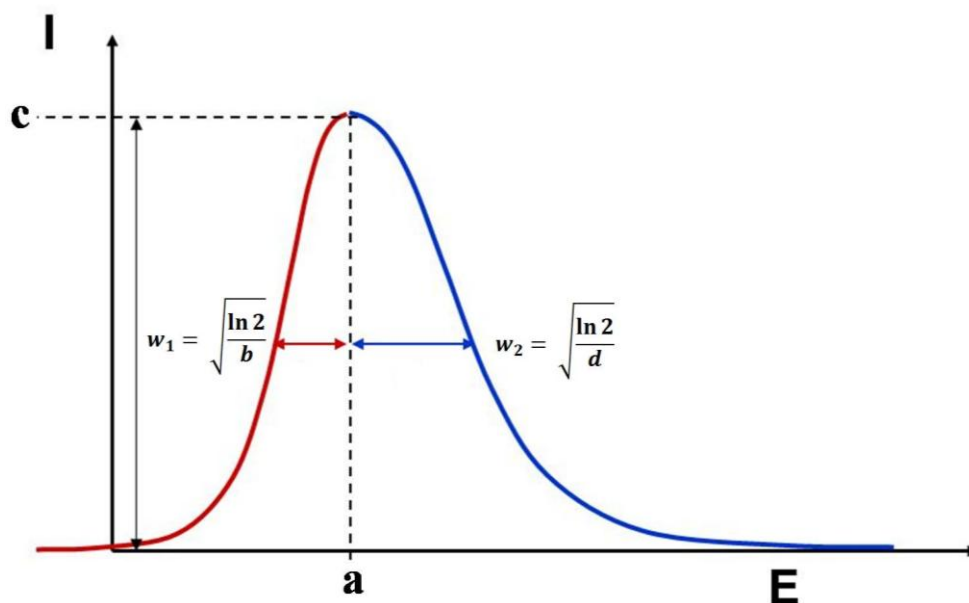


Figura 24. Ejemplo de señal voltamperométrica ajustada a través de los parámetros de las dos ecuaciones gaussianas. a = posición, w_1 = anchura a media altura de la gaussiana de la izquierda, c = intensidad máxima y w_2 = anchura a media altura de la gaussiana de la derecha. $w_1 + w_2$ = anchura a media altura del pico.

La Figura 25 resume mediante un diagrama de flujo el funcionamiento y los procesos involucrados en el programa GPA, el cual está basado en la metodología PSF-GPA. Este programa, desarrollado en entorno Matlab, requiere la introducción de una serie de matrices de entrada (*inputs*) y, tras el análisis, proporciona otras de salida (*outputs*) tal y como se muestra en la función GPA:

$$\underbrace{[E_{\text{peak}}, W_{\text{peak}}, I_{\text{rep}}, I_{\text{cor}}, a, b, c, d, C, A_{\text{peak}}]}_{\text{Outputs}} = \text{gpa} \left(\underbrace{I_{\text{exp}}, \text{esv}, E, \text{isshift}, \text{expvar}, \text{csel}}_{\text{Inputs}} \right);$$

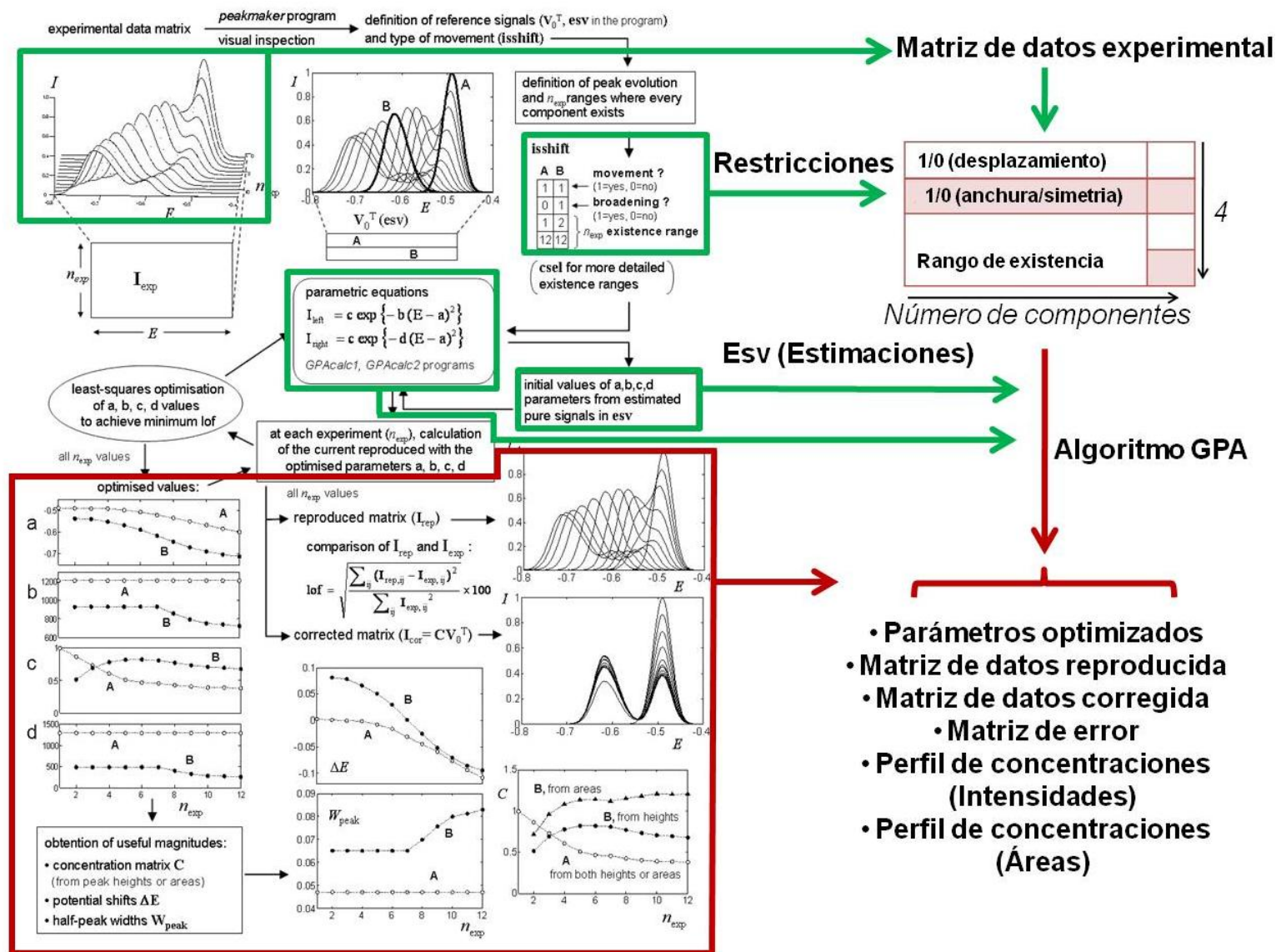


Figura 25. Esquema de la metodología PSF-GPA.

donde los *inputs* son:

- **I_{exp}** = Matriz de datos experimental.
- **esv** = Matriz de componentes (voltamperogramas) estimados.

Esta matriz se calcula con el programa *peakmaker*, dónde de manera visual se determina la forma y la posición de cada señal de pico gaussiano.

- **E** = matriz de potenciales estudiados.

Los valores de potenciales tienen que ser los mismos para todas las medidas.

- **isshift** = matriz de restricciones.

La dimensión de esta matriz corresponde a un número de columnas igual al número de componentes y 4 filas donde se especifican para cada componente una serie de restricciones. En la primera fila, con un 1/0, se establece si el programa ajusta o no el movimiento de cada componente; en la segunda, se fija de igual manera si los componentes cambian de forma o simetría; y en las filas 3 y 4 se restringe la selectividad de cada componente especificando el número de la medida en la que aparece y desaparece la señal de cada uno.

- **expvar** = matriz de variables experimentales.

Esta matriz puede ser la relación metal:ligando, las concentraciones, el pH...

- **csel** = matriz de selectividad.

En esta matriz se define con 1 o 0 la existencia o no de cada componente para cada medida. Es un input opcional, ya que el programa crea él mismo esta matriz mediante los valores de la tercera y cuarta fila de la matriz **isshift**. Es útil en el caso que un componente aparezca, desaparezca y vuelva a aparecer y se quiera definir una restricción de

selectividad, ya que en la matriz **isshift** solamente se tiene en cuenta una aparición y una desaparición por componente.

Los **outputs** son:

- E_{peak} = parámetro a = potencial (posición).

Este parámetro se optimiza para cada componente en cada medida.

- W_{peak} = anchura a media altura.

Se optimiza para cada componente en cada medida.

- I_{rep} = matriz de datos reproducida por el programa.

- I_{cor} = matriz de datos corregida.

En esta matriz cada señal se mantiene en un potencial fijo, es decir se ha corregido el desplazamiento en todas las señales, para un eventual tratamiento posterior por un método lineal.

- Parámetro b = relacionado con la anchura a media altura de la función gaussiana de la izquierda.

Se optimiza para cada componente en cada medida.

- Parámetro c = altura de la señal.

Se optimiza para cada componente en cada medida.

- Parámetro d = relacionado con la anchura a media altura de la función gaussiana de la derecha.

Se optimiza para cada componente en cada medida.

- C = perfil de concentraciones.

Calculado a partir de intensidades o de áreas, según el caso, para todos los componentes del sistema. La elección se hace a través de una pregunta que el programa realiza durante su ejecución.

- A_{peak} = área del pico.

Se optimiza para cada componente en cada medida.

- *lof* = porcentaje de la falta de ajuste.

Corresponde a la falta de ajuste entre los datos reproducidos por GPA y los datos experimentales. Este valor se ofrece de manera visual en la pantalla de Matlab una vez acabados los procesos iterativos de optimización.

Al introducir los inputs en la función GPA hay que tener en cuenta una serie de consideraciones muy importantes para facilitar la optimización de los datos y obtener así buenos resultados y un bajo *lof*. A continuación se describen las etapas necesarias para la aplicación del GPA a valoraciones complexométricas, haciendo especial hincapié en los detalles que proporcionan un ajuste satisfactorio.

- 1) Una vez registrados los voltamperogramas a diferentes relaciones metal/ligando o pHs, los datos se transfieren al entorno de Matlab mediante un programa (gpes) que estructura los datos experimentales en un vector de potenciales y una matriz de intensidades.
- 2) Previamente a su análisis la matriz experimental puede ser pretratada si se considera necesario. Esto significa la eliminación de ruido mediante un suavizado, la corrección de la línea base y el cambio de signo de toda la matriz en caso de tener intensidades negativas, que es lo que ocurre cuando se realizan barridos catódicos.
- 3) Esta metodología está destinada al análisis de datos voltamperométricos no lineales. En estos casos la determinación del número de componentes no se puede hacer como en los modelos lineales, en dónde se utilizan algoritmos como la descomposición en valores singulares (SVD). Por el contrario, este proceso se ha de determinar mediante el conocimiento, al menos parcial, del sistema y/o de la observación visual de los datos. Hay que resaltar dos aspectos: i) en los estudios voltamperométricos los componentes no está relacionados con especies químicas, sino con procesos electroquímicos; y ii) en los datos voltamperométricos, cada proceso electroquímico suele mostrar una señal en forma de pico. Aunque el posible solapamiento entre señales dificulta la selección de componentes, la experiencia y la visualización del experimento

permite detectar su presencia, excepto cuando aparecen completamente solapados. Es en este punto, dónde se requerirá un conocimiento previo del sistema para poder obtener un buen ajuste y unos buenos resultados.

- 4) La matriz de estimaciones iniciales (**esv**) es muy importante para facilitar al programa la optimización de todos los parámetros y evitar resultados erróneos. Por ello, la estimación del voltamperograma unitario de cada componente debe hacerse a partir de la primera señal nítida del componente que aparece en la matriz de datos. Esto es debido a que una vez optimizada la primera señal el programa utiliza los parámetros obtenidos como estimaciones iniciales para estimar la siguiente medida y así sucesivamente. También hay que resaltar que si la señal no se mueve o no cambia de forma (tal como se debe haber especificado en la matriz **isshift**) es importante realizar una estimación precisa de los parámetros **a**, **b** y **d**), pues GPA los mantendrá constantes a lo largo de todas las medidas ajustando el resto de parámetros. Una mala estimación producirá unos resultados inexactos.

- 5) La creación de la matriz de restricciones **isshift** es la pieza clave dentro del algoritmo PSF-GPA. Antes de fijar el desplazamiento o no, el cambio de forma o no, la aparición y desaparición de cada componente, se ha de estar completamente seguro del comportamiento. Una mala interpretación de los datos experimentales hará que se formule una matriz de restricciones errónea y dará lugar a resultados engañosos que no se corresponderán con la naturaleza de los datos.

En algunas ocasiones se debe llegar a un compromiso en la aplicación de restricciones para poder explicar con éxito todos los procesos e interacciones aunque esto cause una mayor falta de ajuste. Un ajuste muy rígido hace que se pierda información y un ajuste libre de todos los parámetros hace que muchas veces los resultados no sean correctos debido a las ambigüedades de los datos.

- 6) Finalmente, tras introducir todos los inputs se procede a la ejecución del programa GPA.

Durante el desarrollo del programa se puso especial atención en el establecimiento de los valores máximos y mínimos de los parámetros optimizables de ambas ecuaciones

gaussianas (Ec. 8.1 y 8.2) en el ajuste de la función *lsqcurvefit*. De esta manera se dotó al programa de una serie de restricciones para que el análisis se ajustase a los datos de origen voltamperométrico. La definición de los márgenes de trabajo durante la optimización de los parámetros mediante GPA ayuda a minimizar las ambigüedades y dota de significado físicoquímico a los resultados.

Las restricciones que están fijadas son:

- i) El parámetro ***a***, correspondiente a la posición de la señal, sólo puede tener *valores posibles de potenciales*, es decir, dentro del intervalo de potenciales de trabajo del sistema de electrodos utilizados.
- ii) Se especifica la *restricción de no negatividad* a través del parámetro ***c***, el cual sólo puede tener valores positivos, con la finalidad de obtener perfiles de concentraciones y señales siempre positivas. Es necesario cambiar el signo a los datos en las medidas catódicas antes de su análisis quimiométrico, tal como se ha dicho anteriormente.
- iii) Los parámetros ***b*** y ***d*** sólo pueden tener valores mínimos y máximos típicos de las señales voltamperométricas.
- iv) Mediante la matriz **isshift** se puede aplicar *restricción de movimiento y/o de forma* manteniendo constantes (o no) los parámetros *a* y/o *b* y *d*, respectivamente.
- v) *Restricción de selectividad* mediante las filas 3 y 4 de la matriz **isshift** donde se define la existencia o no de cada componente en el conjunto de los datos.
- vi) *Restricción de forma* de las señales voltamperométricas (gaussianas) ya que el programa optimiza las señales a través de dos ecuaciones gaussianas.

Estas restricciones proponen la aplicación del PSF-GPA como una metodología de MCR potente, capaz de analizar quimiométricamente datos voltamperométricos tanto lineales como no lineales. El programa GPA fue probado en varios sistemas de cierta complejidad, tanto por el alto grado de solapamiento de las señales como por la importante pérdida de linealidad, producida por el desplazamiento de las señales y por los cambios en la reversibilidad electroquímica.

El sistema que planteó la necesidad de desarrollar esta metodología fue el de la fitoquelatina de cinco unidades (PC_5) y sus complejos con Cd y Pb, que se estudió en un amplio rango de pH [39]. En dicho estudio y en ausencia de metales, se observó una señal de PC_5 que se movía a lo largo del eje de potencial en función del pH, con cambios más que evidentes en su forma y simetría. Esto reducía drásticamente la linealidad de los datos impidiendo la aplicación de métodos como el MCR-ALS. Los datos fueron tratados mediante el programa *pHfit*, con el objetivo de lidiar con el continuo desplazamiento de las señales a lo largo del eje de potenciales, pero se obtuvo una gran falta de ajuste como consecuencia de los progresivos cambios en la anchura y simetría de la señal, cambios que el *pHfit* no puede modelar.

El estudio polarográfico del comportamiento de la PC_5 se repitió en un intervalo de pH entre 2 y 12, más amplio que el previamente considerado [39]. En este estudio se detectaron tres señales o procesos electroquímicos, los cuales están relacionados con la oxidación del mercurio del electrodo (señales anódicas del mercurio) para formar complejos con PC_5 [94]. Como se ha explicado con anterioridad, no se puede determinar el número de componentes mediante funciones como SVD ya que la representación de los valores singulares hace evidente el alto grado de no linealidad en los datos ya que, en este caso, proponía 9 componentes principales para explicar un 89.0% de la varianza de los datos. Es por esto que, tras un análisis visual se decidió que existían tres señales claramente diferenciadas.

Las tres señales que se pueden detectar (Figura 26) son: i) el pico principal (indicada como 1 en la figura) que se mueve continuamente desde *ca.* -0,3 a -0,8 V y que cambia de anchura de manera continua; ii) una señal muy amplia que aparece entre -0,4 y -0,8 V (señal 2 de la figura); iii) y un pico estrecho en *ca.* -0,9 V que predomina a valores altos de pH y prácticamente no se mueve (señal 3 de la figura). Con esta percepción visual, se determinó la matriz de restricciones (**isshift**). Para el componente 1 se ajusta la posición y la forma, en cambio para los otros dos componentes (2 y 3) solo se considera la optimización de sus anchuras. La ejecución del programa GPA con estas restricciones proporciona una buena reproducción de la matriz de datos, con una falta de ajuste de tan sólo el 5,4%.

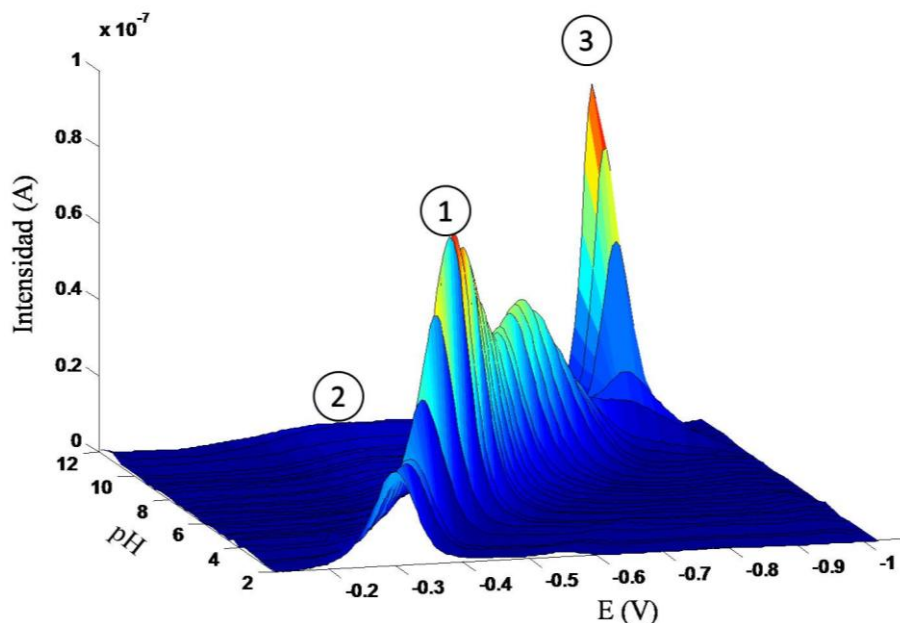


Figura 26. Gráfica 3D de la valoración de pH de la fitoquelatina PC5.

Hay que comentar que la primera señal es la más interesante para determinar la capacidad de análisis de la metodología PSF-GPA, ya que tiene un desplazamiento constante a lo largo del intervalo de pH. Esto se debe a que los protones participan en el proceso electroquímico de oxidación/reducción del sistema PC₅/Hg. Además, la señal presenta cambios muy pronunciados tanto en forma como en simetría, causados por cambios en la cinética de la reacción electroquímica implicada. Si se asume que las mayores variaciones de los potenciales y/o alturas de los picos se producen a valores de pH cercanos al pK_a de los grupos que participan en el enlace, se pueden identificar los grupos funcionales implicados en el mismo. Estos cambios se producen a valores de pH cercanos a 5 y a 8, lo que sugiere la unión del mercurio al péptido a través de enlaces con el grupo carboxílico y los grupos tiol/amino.

Tras la aplicación satisfactoria del PSF-GPA a un sistema cuyos datos muestran una gran falta de linealidad, se buscó un sistema que fuera conocido pero que a la vez tuviera una serie de complicaciones con el objetivo de analizar la robustez y la validez de la metodología PSF-GPA en el análisis de datos voltamperométricos no lineales. Con ese objetivo se seleccionó el sistema Zn-oxalato, el cual es un buen ejemplo ya que presenta una señal que muestra un desplazamiento progresivo hacia potenciales más negativos y un aumento creciente en la anchura del pico a lo largo del experimento

(Figura 27); además existe el problema de la precipitación del complejo ML_2 , aunque éste se trató de minimizar utilizando una concentración inicial de $Zn(II)$ pequeña.

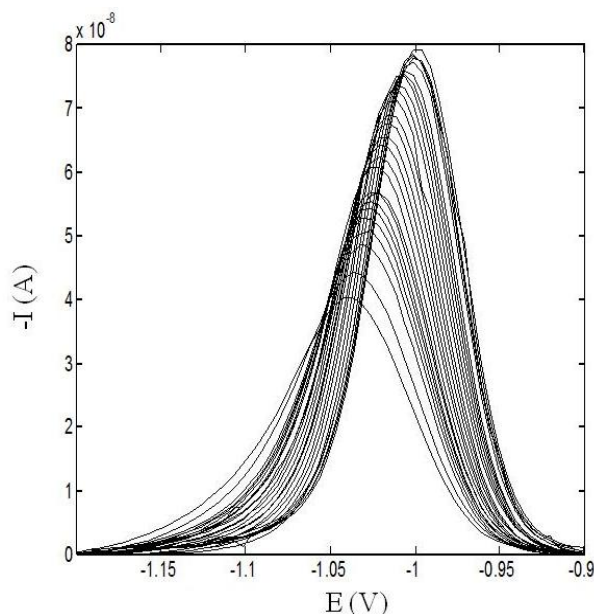


Figura 27. Matriz de datos experimentales (intensidad vs. potencial) correspondiente a una valoración mediante DPP de $Zn(II)$ 10^{-5} mol L^{-1} con oxalato en un medio $0,16$ mol L^{-1} KNO_3 .

La señal de reducción de Zn (que corresponde tanto al metal libre como al complejo) se analizó mediante el uso de diferentes programas. Se utilizó el modelo lineal MCR-ALS y el programa *pHfit* con el objetivo de corregir el desplazamiento, pero en ambos casos el *lof* era considerablemente alto. En cambio, al aplicar el PSF-GPA a los datos experimentales, el ajuste de las señales a la doble gaussiana permitió obtener una reproducción satisfactoria de los datos con un *lof* de sólo 4,6%. A pesar del buen ajuste y reproducción de los datos se miró si los parámetros ajustados por el PSF-GPA eran coherentes y si los resultados estaban afectados por ambigüedades de tipo rotacional.

En el perfil de concentración calculado a partir de la intensidad de pico (parámetro *c*) se observa una disminución progresiva de ésta, tal y como se deduce visualmente en los datos experimentales. Este comportamiento contrasta con lo que se observa en el perfil de concentración calculado a partir de las áreas (Ec. 8.3; para el cálculo de áreas se utilizan los parámetros *c*, *b*, y *d*) donde se observa como la señal se mantiene prácticamente constante durante todas las medidas. Este comportamiento es lógico, ya

que al producirse cambios en la forma y no en la concentración (de Zn) se puede producir un cambio en la intensidad pero el área debe de ser constante. Para analizar si el ajuste del desplazamiento de la señal es correcto, se calcula a través de su posición (parámetro a) durante el experimento, las constantes globales de estabilidad de los complejos ML y ML₂ del sistema Zn-oxalato, utilizando el área del pico, los potenciales optimizados y las concentraciones de metal y ligando en cada medida. A pesar de que las medidas pueden verse afectadas por la irreversibilidad electroquímica, se obtuvieron unos valores de constantes de $\log \beta_1 = 3,84$ y $\log \beta_2 = 6,85$, que son análogos a los que aparecen en la literatura [117]. En este primer artículo la metodología quimiométrica PSF-GPA mostró ser suficientemente precisa, robusta y valiosa para el análisis de datos voltamperométricos no lineales.

La exitosa aplicación de PSF-GPA hace que esta nueva estrategia quimiométrica se postule como una metodología útil para el estudio de datos voltamperométricos que se comportan de manera no lineal. Sin embargo, toda esta ventaja puede verse comprometida por la falta de un vínculo que relacione los sucesivos voltamperogramas del conjunto de datos experimentales, los cuales son ajustados de manera independiente. De hecho, el único vínculo existente es que los parámetros optimizados para cada voltamperograma se utilizan como estimaciones iniciales del voltamperograma siguiente.

Para resolver este inconveniente se implementaron unas restricciones transversales para fijar, y a la vez optimizar, el comportamiento de las señales a lo largo de los diferentes voltamperogramas y dar más sentido fisicoquímico a los resultados. El desarrollo del programa GPA2D se basa en la metodología PSF-GPA y la utilización de parámetros ajustables. Se aprovecha la relación de los parámetros ajustables con algunas características de los picos para aplicar varias restricciones transversales, las cuales se centran en: i) el ajuste del movimiento de las señales durante una valoración del pH con una dependencia lineal o sigmoidea; ii) el ajuste de constantes de complejación a los perfiles de concentración para los sistemas metal-ligando.

Restricción de ajuste del movimiento

Los estudios de evolución de señales con el pH son habituales en electroanálisis. Para el análisis de estos datos que a veces presentan una dramática pérdida de linealidad, se desarrolló en el grupo, como ya se ha dicho, el programa *pHfit*. Pero aun pudiendo

ajustar el desplazamiento de las señales de manera lineal o sigmoidea es notable la falta de ajuste. Esto es debido a que, además de la implicación de los protones en los procesos electroquímicos que produce un desplazamiento de las señales, existen cambios en la cinética y, en consecuencia, cambios en la forma de las señales, siendo en este punto es donde el *pHfit* no es capaz de lograr un buen ajuste.

Con este fin se implementó a la metodología PSF-GPA una serie de restricciones en el desplazamiento de las señales. Este nuevo programa llamado GPA2D, puede aplicar diferentes tipos de restricciones al movimiento de las señales a través de una serie de ecuaciones, las cuales se deducen a partir de aproximaciones químicas, tal y como se muestra en el artículo. El tipo de restricciones del movimiento se especifica en la primera fila de la matriz de restricciones **isshift** donde (0) significa que el componente no se mueve, (1) para un ajuste lineal y (2) para un ajuste sigmoideo.

El funcionamiento del programa GPA2D (modo restricción de movimiento) es el siguiente:

- i) El programa hace una primera optimización de todos los parámetros de cada componente a través del ajuste paramétrico de la doble gaussiana (PSF-GPA) en todo el conjunto de los datos.
- ii) Estos parámetros optimizados los utiliza el programa como estimaciones iniciales para el posterior ajuste iterativo mediante mínimos cuadrados a través de la optimización *lsqcurvefit* aplicando cada restricción de movimiento (E_{peak} vs. pH) especificada para cada componente a través del parámetro **a**.
- iii) Una vez ajustado el parámetro **a**, con la restricción de forma establecida, se vuelve a ejecutar la optimización mediante PSF-GPA, pero esta vez el parámetro **a** de cada componente se mantiene restringido a las ecuaciones optimizadas.

GPA2D se probó en los sistemas PC_2 y Cd(II):PC_2 y los resultados obtenidos se comparan con los obtenidos con el programa *pHfit*. El comportamiento de las señales del sistema metal-ligando Cd(II):PC_2 a un ratio de 1:2 con el pH es bastante complicado, con muchas señales superpuestas que se desplazan a través del eje de potencial durante toda la valoración de pH (Figura 2a del artículo). En este sistema se estableció la existencia de 6 componentes: 2 sin movimiento, 1 con ajuste lineal y 3 con restricción sigmoidea. En otra gráfica (Figura 2b del artículo) se muestra la

optimización inicial de los parámetros \mathbf{a} para todos los componentes y las ecuaciones ajustadas a estos para cada uno. Finalmente, se aplica la restricción del E_{peak} a la ecuación previamente optimizada (Figura 2c del artículo).

Los datos optimizados utilizando las ecuaciones tanto lineales como sigmoideas son parecidos a los obtenidos con el programa *pHfit*. Sin embargo, en todos los casos GPA2D muestra un valor mucho más bajo de falta de ajuste (*lof*), lo que indicaría que los parámetros son más precisos aplicando esta metodología.

Restricción de equilibrio químico

Las interacciones metal-ligando ha sido ampliamente estudiadas en los últimos años en nuestro grupo de investigación y el cálculo de las constantes de complejación, aplicado como una restricción a metodologías de *soft modelling* como el MCR-ALS, también se ha considerado [36]. No obstante, la linealidad de los datos era un punto imprescindible para su aplicación y para la obtención de valores correctos. Por ello, se ha implementado a esta metodología, cuya simplicidad y capacidad de resolver sistemas no lineales ha quedado demostrada, una restricción transversal de equilibrio químico a través del parámetro c .

La optimización de las constantes de complejación se realiza a través de ecuaciones de equilibrio químico. GPA2D utiliza dos matrices adicionales correspondientes a la concentración de metal y de ligando en cada una de las medidas analizadas junto a las señales de intensidad (parámetro c) del metal y de los complejos formados. Así, a través de las ecuaciones de equilibrio químico y tras un ajuste mediante mínimos cuadrados (algoritmo *lsqcurvefit*) se optimizan los valores de las constantes de complejación del sistema estudiado. En los datos donde las señales de los complejos no son apreciables o no aparecen (por ejemplo, porque aparecen fuera del intervalo de trabajo del electrodo utilizado), GPA2D es capaz de calcular, aunque no con tanta precisión, las constantes de formación considerando únicamente la señal del metal y las dos matrices de concentraciones.

La restricción de equilibrio químico del GPA2D, pide introducir durante su ejecución una serie de datos a través de respuestas a las siguientes preguntas: i) el número de complejos que se forman en el sistema metal-ligando estudiado; y ii) si la optimización de las constantes de complejación se realiza a través de la señal solo del metal o de la de

éste y la de sus complejos. Por ello, es necesario tener un conocimiento previo o realizar estudios preliminares con el objeto de conocer a qué especie corresponde cada señal y el número de complejos que se forman. El funcionamiento del programa GPA2D (con la restricción de equilibrio químico) es el siguiente:

- i) El programa hace una primera optimización de todos los parámetros de cada componente a través del ajuste paramétrico de la doble gaussiana (PSF-GPA) en todo el conjunto de los datos (Figura 3a del artículo).
- ii) Estos parámetros optimizados los utiliza el programa como estimaciones iniciales para el posterior ajuste iterativo mediante mínimos cuadrados a través de la optimización *lsqcurvefit* aplicando la restricción de equilibrio químico (cálculo de constantes de complejación) para cada complejo del sistema metal-ligando estudiado mediante el parámetro c y las dos matrices adicionales en las que se especifica la concentración de metal y de ligando existente en cada medida.
- iii) Una vez ajustado el parámetro c a la restricción de constantes de formación de los complejos, se vuelve a ejecutar la optimización mediante PSF-GPA pero esta vez el parámetro c del metal o del metal y sus complejos permanece restringido al optimizado tras el cálculo de las constantes de complejación (Figura 3b del artículo).

GPA2D fue probado con tres sistemas metal-ligando diferentes:

- 1) Zn(II)-oxalato: en este sistema el pico de Zn(II) se desplaza de manera constante, únicamente aparece un sola señal en todas las medidas (Figura 27). No obstante, se ajusta el conjunto a tres señales que corresponderían a la reducción del Zn(II) libre y a las reducciones del Zn de los dos complejos que se forman. La complejidad de este sistema reside en los cambios de reversibilidad y al total solapamiento de las señales.
- 2) Cd(II)-1,10-fenantrolina: los datos experimentales muestran una señal de Cd(II) la cual va disminuyendo a medida que avanza el experimento y, a la vez, a potenciales más negativos aparece la señal correspondiente al primer complejo que se forma, la cual presenta un desplazamiento continuo y un cambio de forma

a lo largo del experimento debido a la formación sucesiva de tres complejos Cd(II)- 1,10-fenantrolina (Figura 28).

En la literatura, encontramos que este sistema y el anterior fueron estudiados sin problemas mediante MCR-ALS aplicando la restricción de equilibrio químico, ya que las señales de los complejos, aunque presentan un desplazamiento, éste es lo suficientemente pequeño como para tratarse como un sistema lineal [36].

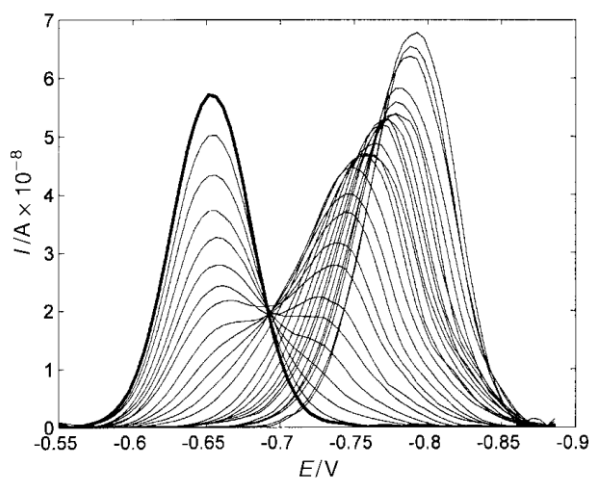


Figura 28. Matriz experimental (DPP) de la valoración de 1×10^{-5} mol L⁻¹ de Cd (II) con 1,10-fenantrolina (hasta $7,3 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹) en medio 0,01 mol L⁻¹ acético/acetato a pH 5,0. La línea gruesa corresponde a la señal de Cd(II) en ausencia de ligando.

- 3) Cu(II):BAP: este sistema ofrece una señal independiente para el metal Cu(II) libre y una señal para sus dos complejos. Las señales de los complejos están completamente solapadas mostrando un cambio constante en las cinéticas y un desplazamiento tan grande que es imposible el análisis mediante técnicas quimiométricas lineales (Figura 3a del artículo).

GPA2D permite determinar las constantes de complejación de todos los complejos en los tres sistemas estudiados, tanto a partir de la señal del metal y de sus complejos, como a partir únicamente de la señal del metal. Los valores optimizados por el programa están en concordancia con los encontrados en la literatura (Tabla 2 del artículo). Además, la aplicación de la restricción de constantes de formación proporciona a los resultados una valiosa carga de información fisicoquímica con una

falta de ajuste baja, a pesar de que en algunos casos el *lof* es superior a un 10%. Posiblemente, esto se deba a que para el cálculo se utiliza la intensidad de los picos y, aunque GPA2D es capaz de ajustar perfectamente el desplazamiento, los cambios en la cinética alteran la relación entre la intensidad y la concentración. En casos como éste, sería más correcto si GPA2D utilizara las áreas para el cálculo de las constantes de complejación, aunque en esta versión no es posible hacerlo. Así pues, parece razonable desarrollar en el futuro versiones de GPA2D que puedan utilizar las áreas para el cálculo de las constantes de complejación.

La Tabla 6 resume las características más relevantes de los nuevos programas desarrollados basados en la metodología PSF-GPA, y las compara con las metodologías ya existentes de resolución de curvas multivariante (MCR) que pueden utilizarse en la identificación de modelos químicos de datos voltamperométricos.

Tabla 6. Tabla comparativa de las principales características de los programas desarrollados con las metodologías previas.

<i>Método</i>	MCR-ALS (sin restricción)	MCR-ALS (restricción forma de pico)	MCR-ALS (restricción de equilibrio)	<i>Shiftfit</i>	<i>pHfit</i>	GPA	GPA2D
¿Aplicable a datos bilineales?	Si	Si	Si	Si	Si	Si	Si
¿Aplicable a datos no bilineales?	No	No	No	Si	Si	Si	Si
¿La señal está descrita por una ecuación paramétrica?	No	Si	No	No	No	Si	Si
Evolución paramétrica de:	Concentración	No	No	Si	No	No	Si
	Señal pura	No	No	No	No	Si	Si

Capítulo 9

Aplicación a sistemas de interés biológico y medioambiental

Este capítulo engloba tres trabajos en donde se estudian diferentes sistemas metal/ligando, principalmente por técnicas polarográficas. La complejidad en los datos requirió un tratamiento quimiométrico y se aplicó la nueva metodología desarrollada (PSF-GPA) en la presente Tesis Doctoral y explicada en el capítulo anterior. Estos estudios se han complementado con otras técnicas como la espectrometría de masas de ionización por electrospray, la espectrofotometría UV-vis y valoraciones calorimétricas ITC. La combinación y el uso complementario de todas estas técnicas proporcionan información adicional y una mayor robustez en los resultados. Además, permite la validación de los resultados obtenidos tras el análisis quimiométrico de los datos voltamperométricos mediante el método GPA.

9.1. Introducción

Las técnicas voltamperométricas han sido ampliamente utilizadas en el estudio de diferentes sistemas complejantes metal/ligando. Las ventajas que ofrecen estos métodos son: proporcionan información de manera directa pudiendo trabajar a niveles muy bajos de concentración de metal, las señales tienen una fuerte dependencia con la especiación del metal, lo que permite diferenciar entre los estados de oxidación del metal, sus formas químicas y, en general, no es necesaria ninguna etapa de pretratamiento de la muestra acuosa.

La complejidad de los datos obtenidos en los estudios de especiación obliga a tratar las matrices de datos con herramientas quimiométricas y de esta manera asegurar que se obtiene la máxima información sobre estos sistemas. La aplicación de métodos quimiométricos, como el MCR-ALS, ha evidenciado su eficacia para el análisis de datos voltamperométricos obtenidos durante el estudio de la formación de complejos de metales pesados con una gran variedad de ligandos de interés medioambiental o biológico, tales como los ácidos húmicos, las fitoquelatinas, las metalotioneínas, el glutatión, el ácido lipoico, los agentes quelantes, etcétera [37,39,118-120]. La utilización de binomio voltamperometría-quimiometría para el estudio de los sistemas metal-ligando, se basa en la realización de valoraciones voltamperométricas de una disolución de metal con el ligando considerado, o viceversa, para posteriormente analizar el conjunto de datos experimentales mediante la metodología MCR-ALS.

Aunque la metodología MCR-ALS ha permitido resolver sistemas muy complejos, existen comportamientos que provocan un aumento en la complejidad de los datos. Estos se pueden volver más intrincados debido a la extrema superposición de señales (producida mayoritariamente por la aparición y superposición de señales anódicas) y a la pérdida de linealidad de los datos electroquímicos (variaciones de potencial y/o forma del pico), fundamentalmente. Este último punto compromete la aplicabilidad del MCR-ALS ya que se obtienen resultados que no reflejan correctamente los procesos que tienen lugar. Para resolver estas deficiencias se realizaron adaptaciones metodológicas, como el análisis MCR-ALS combinando matrices voltamperométricas con espectroscópicas o el desarrollo de nuevas herramientas quimiométricas (*shifit* y *pHfit*) para corregir los desplazamientos laterales de señales. Aún así, todavía había datos voltamperométricos que no podían ser analizados. El desarrollo de la metodología PSF-

GPA se postuló como una nueva estrategia para el estudio quimiométrico de las señales voltamperométricas en forma de pico, que no se comportan de manera lineal.

Esta nueva metodología descrita en el capítulo anterior se ha aplicado a tres sistemas de interés biológico y medioambiental. En estos trabajos se han utilizado también otras técnicas analíticas para complementar o corroborar los resultados obtenidos por voltamperometría. A continuación, se comentan brevemente los sistemas estudiados.

El análisis de las interacciones en los sistemas de multimetal (Cd(II), Cu(II), Pb(II)) y fitoquelatinas de diferente tamaño es muy útil para entender los diferentes procesos involucrados en la fitorremediación. La contaminación de los suelos con metales es un grave problema medioambiental, sobre todo en zonas cercanas a minas, fundiciones o lugares donde de manera natural existe una concentración peligrosa de estos para el medioambiente. La fitorremediación se basa en el uso de plantas para la descontaminación de compuestos orgánicos tóxicos [121] y metales [122] en aguas y suelos contaminados. Las fitoquelatinas son péptidos de estructura $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ (donde, $n=2-5$), que están implicadas en la descontaminación de metales pesados a través de plantas, algas y algunos hongos. La síntesis de las PCs está controlada por la enzima fitoquelatina sintasa (PCS) a través de su precursor el glutatión (GSH). La activación de la enzima viene dada por la propia presencia de algunos metales pesados en el interior de la célula.

Durante la exposición multimetal se han demostrado efectos sinérgicos y antagónicos debido a la competición de los metales por los sitios de unión para formar enlaces. Se ha visto que hay metales que favorecen la síntesis de PCs y, sin embargo, la existencia en el medio de metales con una mayor capacidad para formar complejos, implica que estos son los que interactúan con las PCs sintetizadas [123]. Por otro lado, la capacidad de complejación de las diferentes fitoquelatinas, según sea su tamaño, juega un papel clave en estos procesos [124], aunque es necesario considerar que normalmente hay una mayor proporción de PC₂, debido a que es la primera en ser sintetizada y las demás se forman a partir de ésta.

El estudio de la *complejación de arsénico (III) con los agente quelantes DMSA y DMPS* es muy interesante a nivel médico. El arsénico es bien conocido por su toxicidad y puede encontrarse en multitud de lugares como pueden ser ciertos suministros de agua, en mariscos, en pigmentos, en el humo de los cigarrillos, etcétera. Además hay regiones

donde de manera natural existe una alta contaminación de As debido a su geología, llegando a producirse grandes problemas de contaminación en el agua potable [56,82]. La intoxicación por As está asociada a diversas enfermedades humanas, tales como la diabetes, la enfermedad de pie negro y algunos tipos de cánceres.

Este problema global ha llevado al desarrollo de diferentes fármacos para la desintoxicación de As en el organismo. Entre ellos, los más habituales son los agentes quelantes DMSA (ácido dimercaptosuccínico) y DMPS (dimercapto-propano sulfonato) [76-77,82]. Estos dos compuestos tienen en su estructura grupos tiólicos los cuales tienen una fuerte afinidad con una gran cantidad de metales y metaloides. Estos compuestos una vez han capturado el metal lo extraen del organismo en forma de complejo.

El sistema complejante *cobre(II)/6-Bencilaminopurina (BAP)* resulta relevante tanto por sus aplicaciones biológicas como médicas [83,86]. Por un lado, el BAP es una citoquinina sintética de tipo adenina comúnmente utilizada en la agricultura por sus propiedades como regulador de crecimiento vegetal y estimulador de la división celular. Por otro, el BAP y sus derivados se han postulado como agentes antitumorales, ya que son capaces de inducir la apoptosis celular y detener el progreso de las células cancerosas [87].

Centrándose en su efecto antitumoral, existe una notable bibliografía de investigación sobre este efecto. Esta capacidad anticancerígena resulta mayor cuando el BAP o sus derivados forman complejos con ciertos metales de transición (Pt, Co, Cu, Fe y Pd). El efecto citotóxico depende tanto del ion metálico como del tipo de sustituyentes en la adenina, y particularmente, son los complejos con Cu(II) los que presentan una actividad antitumoral más fuerte que sus respectivas formas no complejadas [90].

9.2. Voltammetric Analysis of Phytochelatin Complexation in Ternary Metal Mixtures Supported by Multivariate Analysis and ESI-MS.

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

Electroanalysis 24 (2012) 309–315.

Voltammetric Analysis of Phytochelatin Complexation in Ternary Metal Mixtures Supported by Multivariate Analysis and ESI-MS

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

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain
phone: (+34)-93-402-15-45, fax: (+34)-93-402-12-33
*e-mail: cristina.arino@ub.edu

Received: October 7, 2011

Accepted: November 23, 2011

Abstract

The competitive binding of Cu^{2+} , Cd^{2+} and Pb^{2+} in ternary mixtures by the phytochelatins PC_2 and PC_5 (PC_n ; $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, $n=2$ and 5) are examined by voltammetry, which allows one to follow the displacements of the voltammetric signals induced by the competitive binding among the metal ions towards PC_2 or PC_5 complexation, and direct injection positive-mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS), in order to obtain the stoichiometries of the complexes. Voltammetric data are analyzed by Gaussian Peak Adjustment (GPA), which is a recently developed multivariate analysis method for nonlinear electrochemical data. Different complexes have been detected or deduced their presence, depending on the experimental conditions. Ternary complexes CuCdPC_n and CdPbPC_n were detected for both PC_2 and PC_5 , while the ternary CuPbPC_n complex was only detected for PC_2 . Some of the complexes have been only detected by ESI-MS because in some cases voltammetry data could not be totally resolved, even by using GPA. The quaternary CdPbCuPC_n complex has been detected for PC_5 , but for PC_2 data are not so conclusive. In summary, the signal evolution for mixed CdCuPC_n complexes is quite different. These observations could be a reflection of an antagonistic effect for the case of PC_2 and a synergetic one for PC_5 .

Keywords: Phytochelatin, Metal Complexation, Voltammetry, Chemometrics, ESI-MS

DOI: 10.1002/elan.201100578

Supporting Information for this article is available on the WWW under <http://dx.doi.org/10.1002/elan.201100578>

1 Introduction

Phytoremediation is a strategy that uses plants to detoxify organic contaminants [1,2] and toxic metals [3,4] from contaminated groundwater and soil. It is especially attractive because of its low cost and energy requirements. Research has focused upon gene expression involved within the process [5], efficiency improvement by the use of genetic engineered plants [6] or application of chelating agents [7].

Contamination of soils with metals is a problem in zones near of mining and smelting [4,8]. Phytochelatins (PC_n), $(\gamma\text{Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ ($n \geq 2$), are involved in the detoxification of metals in higher plants and microorganisms. Synthesis of PC_n is mediated by phytochelatin synthase, involves glutathione (GSH) and is activated by some metals [9] in different ways. The effect of metals on PC_n synthesis is critical to understand their production in field studies. Multi-metal exposure has demonstrated metal- and concentration-dependent synergisms and antagonisms effects due to the metal competition for binding sites. It has been demonstrated that there are metals that favor PCs synthesis in great extension. However if other metals with higher capacity to form complexes exist in the media, they will interact with the synthesized PCs [10,11]. By other hand, the complexing capacity of the different

PCs also plays a key role [12,13], although it is necessary to consider that in the nature a majority of PC_2 is expected because it is the first to be synthesized.

Electroanalytical techniques have been successfully used for the study of Cd^{2+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Co^{2+} and Cu^{2+} complexes with GSH or PC_n [14–16]. In many cases, to maximize information about the systems, data matrices are treated with chemometric tools like Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares, MCR-ALS [17], or Gaussian Peak Adjustment (GPA) [18], which is a recently implemented alternative to MCR-ALS that accounts for non-linearity in voltammetric measurements. Examples are competition of PC_n with metals [19,20] and the role towards Cd^{2+} complexation of PC_n -chain length (PC_{1-5}) [13].

In the present work, the competitive binding among Cd^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+} ions towards phytochelatins PC_2 and PC_5 binding is examined by a combination of different analytical techniques and methods. Differential Pulse Polarography (DPP) data are analyzed by MCR-ALS and GPA, which allow us to follow the induced displacements among metal ions towards PC_2 and PC_5 . Positive mode Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) is used to determine the stoichiometries of the complexes.

2 Experimental

2.1 Chemicals and Instrumentation

The phytochelatins PC₂ and PC₅, (γ Glu-Cys)_n-Gly (*n* = 2, 5), as trifluoroacetate salts, were provided by DiverDrugs S. L. (Barcelona, Spain) with a purity of 96.9% and 98.4% respectively. PC_n stock solutions (1 mL, 10⁻³ mol L⁻¹) were prepared daily. To ensure homogeneity, solutions were mixed at 1400 rpm for 1 minute using Eppendorf Mixmate.

All other reagents were of analytical grade from Merck. Cd²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and Cu²⁺ stock solutions (10⁻² mol L⁻¹) were prepared by dissolving the respective metal salt in water and standardized complexometrically. BIS-TRIS (2,2-bis(hydroxymethyl)-2,2',2''-nitrioltriethanol) was used as pH buffer, and KNO₃ as supporting electrolyte. All solutions were prepared freshly with buffer deoxygenated by nitrogen. At the selected conditions both metal hydrolysis and complexation by buffer can be present but the influence in the qualitative evolution of the uncomplexed metal does not affect the main complexation process.

Voltammetric measurements were performed with Metrohm-757 VA Computrace. Working, reference and auxiliary electrodes were static mercury drop electrode (SMDE), Ag/AgCl, KCl (3 mol L⁻¹), and glassy carbon rod respectively (Metrohm). Positive-mode ESI-MS spectra were obtained by a Q-TOF Agilent 1100, and pH measurements by an Orion SA 720 pH-meter. All the experiments were carried out at 20 °C. Double distilled Hg and purified nitrogen (Linde N50) were used.

2.2 Procedures

2.2.1 Complexometric Titrations

Complexometric titrations were performed by DPP at 5 × 10⁻² mol L⁻¹ BIS-TRIS (pH 6.5)–5 × 10⁻² mol L⁻¹ KNO₃. 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: 0.9 mm² drop area, 5 mV voltage step, 50 mV pulse amplitude, 0.05 s pulse time, 1 s drop time and 50 mV s⁻¹ sweep rate. After deaerating with pure N₂ for 20 min, DPP curves were recorded. Further, successive additions of 10⁻³ mol L⁻¹ Cu²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, or PC_n solution were made and, after purged with N₂ and mechanically stirred for 1.5 min, curves were again recorded. Data were corrected for dilution effects.

2.2.2 Electrospray Ionization Mass Spectrometry Experiments

Direct injections of 50 μL samples, in 2 × 10⁻² mol L⁻¹ ammonium acetate/NH₄OH buffer (pH 6.5), were carried out at 0.1 mL min⁻¹ flow rate, with 150 °C source temperature and 300 °C desolvation temperature. A 1:9 acetonitrile - 5 × 10⁻³ mol L⁻¹ ammonium acetate mixture

(pH 6.5) was used as solvent. The applied capillary voltage was fixed at 4 kV, and the effect of cone potential was studied at three different values (optimum, 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).

2.2.3 Data Treatment

Voltammograms were smoothed, baseline corrected and converted into data matrices using home-made programs implemented in MATLAB. Chemometric analysis of data [13,19–20] was done through several MATLAB programs (some of them available at <http://www.mcrals.info> and http://www.ub.edu/dqaec/programes_eng.html), among them Gaussian Peak Adjustment (GPA) program [18] to correct peak movement and broadening along the experiment.

Due to the nature of electrochemical measurements, it is important to remark that the concept of “component” in MCR-ALS or GPA refers to the signal from an electrochemical process, and not to a chemical species, as in spectroscopic data. Thus, in the complexes containing one electroactive site (e.g., one metal), one component is associated to the process but also to the species. However, 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 chemometric results. Components assignments are detailed in Supporting Information (SI) for the different types of experiments as described below

3 Results and Discussion

3.1 Voltammetric Analysis of Metal Complexation by PC₅

Voltammetric signal of PC₅ (at –0.60 V) in Hg electrode is due to the formation of Hg-thiolates (see peak 4 in the initial voltammogram in Figure 1). When Cu²⁺ is added, two signals appear at –0.73 V (reduction of Cu²⁺ in Cu/PC₅ complex) and –0.02 V (anodic oxidation of Hg in the presence of Cu/PC₅ complex), which are referred in Figure 1 as peaks 5 and 1 respectively. After some Cu²⁺ additions peak 1 develops a shoulder at –0.08 V. Concentration profiles obtained by GPA program (see Inset in Figure 1) show that at Cu²⁺:PC₅ ratio above 2.5: i) PC₅ is fully complexed (component 4 disappears); ii) Cu-PC₅ complex stabilizes (component 5); and iii) free Cu²⁺ appears (component 2). It should be mentioned that the reduction of Cu²⁺ in Cu-PC₅ complexes appear at the same potential region than that of Cd²⁺ in Cd-PC₅ [20]. This implies an additional difficulty for solving systems where these two metals are present. On the other hand compo-

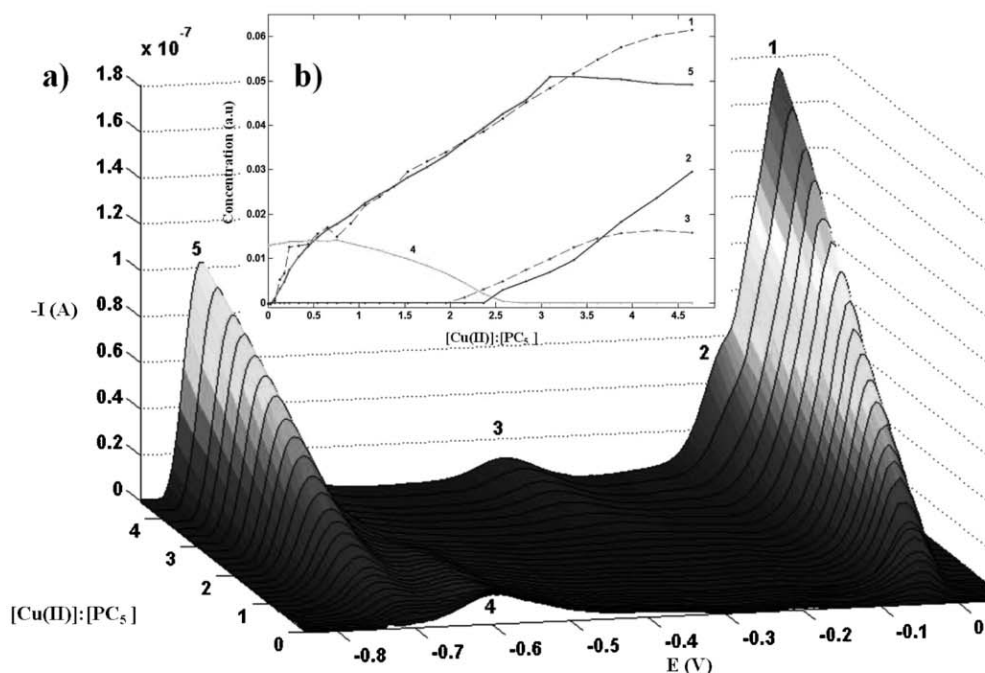


Fig. 1. Voltammograms obtained in the titration of $10 \mu\text{molL}^{-1}$ PC_5 with Cu^{2+} in BISTRIS buffer at pH 6.5. Inset: Concentration profiles obtained after GPA analysis of those voltammograms. Components assignments: 1) anodic oxidation of Hg in the presence of Cu/PC_5 complex; 2) reduction of free Cu^{2+} ; 3) reduction of Cu^{2+} in a weaker Cu/PC_5 complex; 4) anodic oxidation of Hg in the presence of free PC_5 ; 5) reduction of Cu^{2+} in a stronger Cu/PC_5 complex.

nent 3 in Figure 1 seems to be related to the reduction of Cu^{2+} weakly bound in $\text{Cu}-\text{PC}_5$ complex.

Additions of Zn^{2+} to PC_5 produced a systematic growth of free Zn^{2+} reduction peak from $\text{Zn}^{2+}:\text{PC}_5$ ratios above 1:2 (component 4 at -1.02 V in Figure S1a, in SI), and very low (irreversible) signals for reduction of Zn^{2+} in $\text{Zn}-\text{PC}_5$ complex (at -1.15 V in Figure S1a). Complexation is confirmed by the signal at -0.47 V (anodic oxidation of Hg in the presence of $\text{Zn}-\text{PC}_5$ complex).

If we consider the complexing capacity (CC) of PC_5 towards these metals, similar values are obtained for Cu^{2+} (ca. 2.5; see evolution of component 4 in Figure 1) and Cd^{2+} (ca. 2.3) [20], and considerably lower for Pb^{2+} and Zn^{2+} (ca. 1) [13]. The case of Cu^{2+} is particularly interesting by several reasons: i) Complexation of Cu^{2+} by thiols can be unstable due to both reduction to Cu^+ and oxidation to disulfide, and this can take up to 40 minutes [21]; ii) Cys is oxidized more readily than GSH and, therefore than PC_n (although it is unknown whether this reaction occurs intra- or inter-molecularly at low Cys and Cu^{2+} concentrations). Nevertheless, these phenomena do not seem to compromise CC of PC_5 towards Cu^{2+} . It should be noted that present CC of PC_5 is equal to CC reported for PC_4 at more alkaline medium [22], where more thiol groups are deprotonated and available as binding sites.

3.2 Voltammetric Analysis of the Competitive Complexation of Binary Metal Mixtures by PC_n

The competitive binding of two metal ions ($\text{Cu}^{2+}/\text{Pb}^{2+}$ and $\text{Cu}^{2+}/\text{Cd}^{2+}$) by PC_n (PC_5 and PC_2 , respectively) has been investigated through two sets of experiments. The corresponding experimental data are summarized in Figures S2 and S3, respectively, in the Supporting Information. In the following, the main results are summarized.

The voltammogram of 1:1 $\text{Pb}:\text{PC}_5$ system shows the peak for the reduction of Pb^{2+} in the complex and the anodic signal of Hg oxidation in its presence (components 6 and 4, respectively, in the first curve in Fig. S2a, SI). Additions of Cu^{2+} provoke a decrease of these signals until a $\text{Cu}^{2+}:\text{PC}_5$ ratio of 2 is attained (Fig. S2b). Then, the signal of free Cu^{2+} reduction appears and progressively increases (component 2 in Fig. S2). Reduction of free Pb^{2+} appears at ratio of 0.5, and stabilizes at the ratio of 2 (component 5). The complexation of Cu^{2+} by PC_5 since the first addition is confirmed by the appearance of Cu^{2+} -complex and the corresponding anodic signal (components 7 and 1, respectively). In the transition from Pb - to Cu -complex, because of the systematic potential shift of component 6, formation of intermediate ternary complexes cannot be refused. The unequivocal interpretation of this process is hindered by the great overlapping of signals 4 and 5 and by the required constrains in GPA resolution, especially at the beginning of the titration, which distort the concentration profiles obtained (Fig. S2b in SI). As in the previous case, component 3

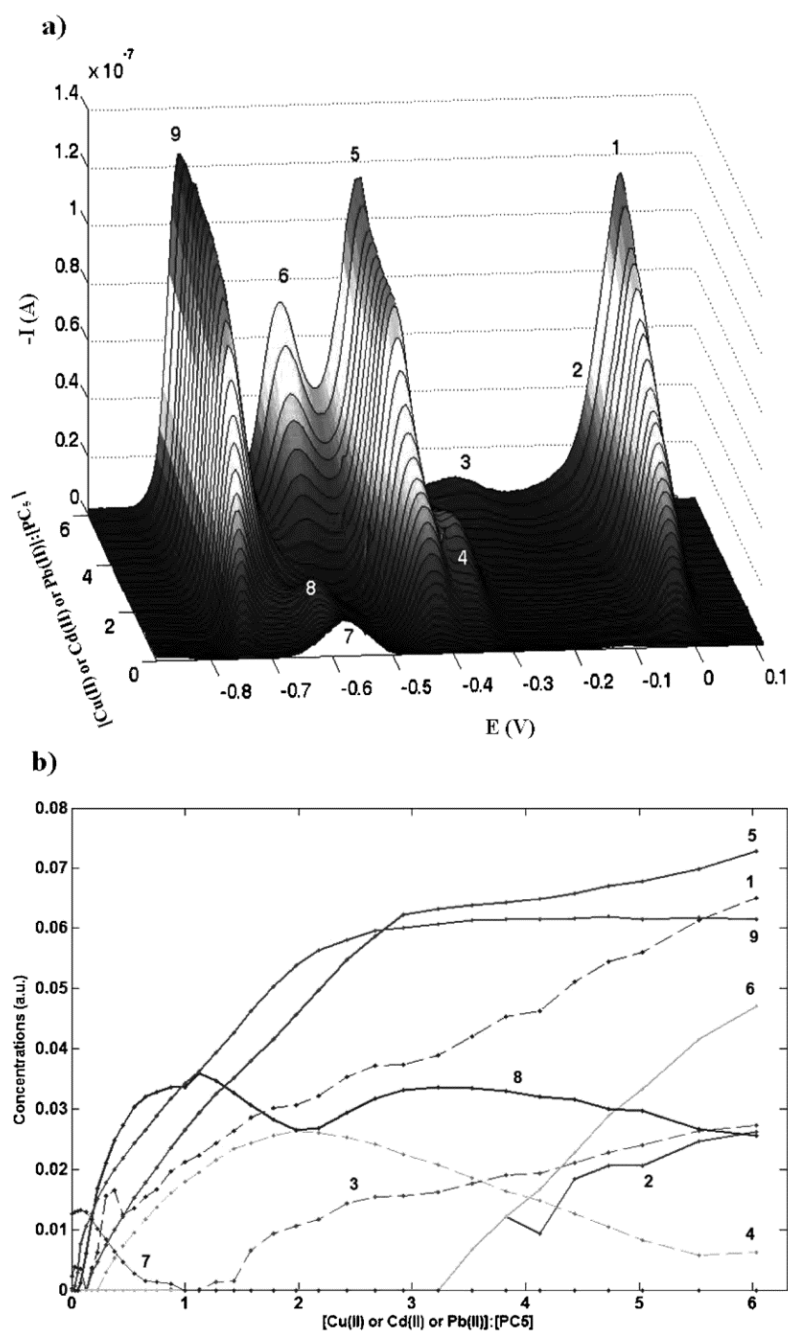


Fig. 2. a) Voltammograms obtained in the titration of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ PC_5 with an equimolar $\text{Cu}^{2+}:\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ mixture in BISTRIS buffer at pH 6.5. b) Concentration profiles obtained by GPA. Components assignments: 1) anodic signal of Cu^{2+} complexes; 2) reduction of free Cu^{2+} ; 3) anodic oxidation of Hg in the presence of Cu^{2+} complexes; 4) anodic oxidation of Hg in the presence of Cd^{2+} complexes; 5) reduction of free Pb^{2+} and anodic oxidation of Hg in the presence of Pb^{2+} complexes; 6) reduction of free Cd^{2+} ; 7) anodic oxidation of Hg in the presence free PC_5 ; 8) reduction of Pb^{2+} in $\text{Pb}(\text{PC}_5)$ complexes; 9) reduction of Cu^{2+} and Cd^{2+} in $\text{Cu}(\text{PC}_5)$ and $\text{Cd}(\text{PC}_5)$ complexes, respectively.

seems to be related to the reduction of Cu^{2+} in a weaker complex.

A similar study was done with Cd^{2+} and the $\text{Cu}^{2+}:\text{PC}_2$ system (Fig. S3). Initially the signals of the reductions of free Cu^{2+} and Cu^{2+} complexed by PC_2 , and the corresponding anodic signal are observed (components 2, 5

and 1, respectively). Along the experiment all the peak currents remain constants out of the free Cd^{2+} reduction signal (component 4). A slight potential shift of the Cu^{2+} - PC_2 complex signal is possibly due to a change in the complex conformation induced by the presence of Cd^{2+} . Thus, Cd^{2+} was neither able to displace Cu^{2+} from its

complex nor bind any thiol of PC₂. Again, component 3 seems to be related to the reduction of Cu²⁺ in a weaker complex.

3.3 Voltammetric Analysis of the Competitive Complexation of Ternary Metal Mixture by PC_n

The competitive binding in ternary metal mixtures has been investigated through three sets of voltammetric experiments and by direct ESI-MS measurements of different mixtures involving PC₂ or PC₅, and Cu²⁺, Pb²⁺ and Cd²⁺. Some of the experimental results are shown in Figures 2–4, and a part of them are summarized in Table S1 of the Supporting Information. In the following, the main results are summarized.

A PC₅ solution was titrated by an equimolar trimetal mixture (Figure 2a). A very intense peak is observed at ca. –0.74 V (component 9), which is related to the reduction of both Cd²⁺ and Cu²⁺ in PC₅ complexes (see Ref. [20] and component 5 in Figure 1, respectively), and also an initial small peak for the reduction of Pb²⁺ in Pb-PC₅ complex (component 8 at –0.61 V; see component 6 in Figure S2a). Then, at the initial additions, PC₅ can bind simultaneously the three cations.

Concentration profiles of that experiment (Figure 2b), which were obtained by GPA analysis with a lof of 13.2%, reveal that signals for the reductions of free Cu²⁺ and Cd²⁺ do not appear until metal:PC₅ ratios higher than 3 (components 2 and 6, respectively). From this value the increase of component 5 is less sharp. That component includes the reduction of free Pb²⁺ and/or the anodic oxidation of Hg in the presence of Pb-PC₅, which could not be satisfactorily solved. Other components are related with anodic oxidation of Hg processes (numbers 1, 3, 4 and 7).

Component 9 is associated with the reductions of Cd²⁺ or Cu²⁺ complexes, including the possibility of mixed CdCuPC₅ species, and stabilizes at ratios higher than 3, which suggest M^IM^{II}PC₅ stoichiometric mixed complexes (see further section and Table S1).

To complete the information on the competition of PC_n towards trimetal complexation, successive aliquots of Cu²⁺ are added to 2:2:1 Cd:Pb:PC₂ and 3:2:1 Cd:Pb:PC₅ mixtures (Figure 3). PC₂ (two thiol groups) and PC₅ (five thiol groups) represent different cases towards simultaneous coordination of three metal ions. In the previous survey of PC_n-chain length influence on Cd complexation [13], some observations were derived: i) stabilities of Cd-PC_{3–5} complexes are greater than those of Cd-PC₂ and other shorter chain peptides (on the basis of the potential shift towards more negative potentials); and ii) the stabilities for Cd-PC_{3–5} complexes suggest that metal ion coordination sphere becomes very similar for these PC_n.

For both titrations, in the initial voltammogram, four signals are present, which can be assigned to: i) the anodic oxidation of Hg in the presence of M²⁺-PC_n complexes (component 3, ca. –0.35 V); ii) reductions of both

free Pb²⁺ and Cd²⁺ (components 4, at ca. –0.45 V, and 5, at ca. –0.58 V, respectively); and iii) reduction of both Cd-PC₂ (at –0.69 V) and Cd-PC₅ (at –0.74 V) complexes (component 6), as previously found [13], which indicates a stronger Cd²⁺ complexation by PC₅ than by PC₂.

After Cu²⁺ additions, the characteristic anodic signal of Hg in the presence of Cu-PC₅ complexes is observed (component 1, at ca. –0.04 V), and it splits when Cu²⁺ is in excess. Thus, the formation of complexes is observed from the beginning of the titration.

Application of GPA algorithm yields the concentration profiles shown in Figures 3b and 3d, with lof of 5.96% and 4.14% respectively. For both titrations, free Pb²⁺ reduction signal is stable throughout titrations and small variations might be assigned to overlapping with signals from anodic processes of Hg (component 4). This feature indicates that Pb²⁺ is not reincorporated into the mixed metal PC_n complex. On the other hand, free Cd²⁺ reduction signal increases in both experiments (component 5), due to the Cu²⁺/Cd²⁺ exchange on the previously formed Cd-PC_n complex. The concentration ratios at which component 5 stabilize suggest that the binding of one Cu²⁺ ion displaces one or two Cd²⁺ ions in PC₂ or PC₅ complex, respectively (see concentration profiles in Figures 3b and 3d). This feature explains why the increase in free Cd²⁺ is greater for PC₅ than for PC₂. For Cu²⁺ signal, the most remarkable difference in this set of titrations concerns the ratio at which Cu²⁺ reduction peak appears (component 2), which is dependent upon the CC of the PC_n in solution (higher for PC₅).

It is important to note that component 6 corresponds in the first voltammogram to a Cd-PC_n complex and, when Cu²⁺ is added, it can be also due to the reduction of both Cd²⁺ and Cu²⁺ complexed to PC_n (both appear in the same potential region). In the case of PC₂ (Figure 3a), when Cu²⁺ binds to the complex, both a slight signal-decreasing and a small signal-shift to less negative potentials are observed for component 6. This minimal change in signals suggests that the incorporation of Cu²⁺ into the Cd-PC₂ does not change significantly the stability of the species. In the case of PC₅ (Figure 3c), when Cu²⁺ integrates into the complex, component 6 shifts very slightly to more negative potentials and its signal increases through the titration. This could mean that the incorporation of Cu²⁺ into the Cd-PC₅ complex yields a new and more stable complex than the one previously formed.

3.4 Study by ESI-MS

ESI-MS experiments of Cd-PC₅ complexes have been previously reported [23], as well as the competition between Pb²⁺ and Cd²⁺ with PC₅ [20]. In the present work, the competitive binding of Cu²⁺, Cd²⁺ and Pb²⁺ by PC₂ and PC₅ has been studied by positive-mode ESI-MS at the experimental conditions as close as possible to the voltammetric ones.

The first set of experiments consisted in the study of the formation of complexes at different Cu:Cd:Pb:PC₂

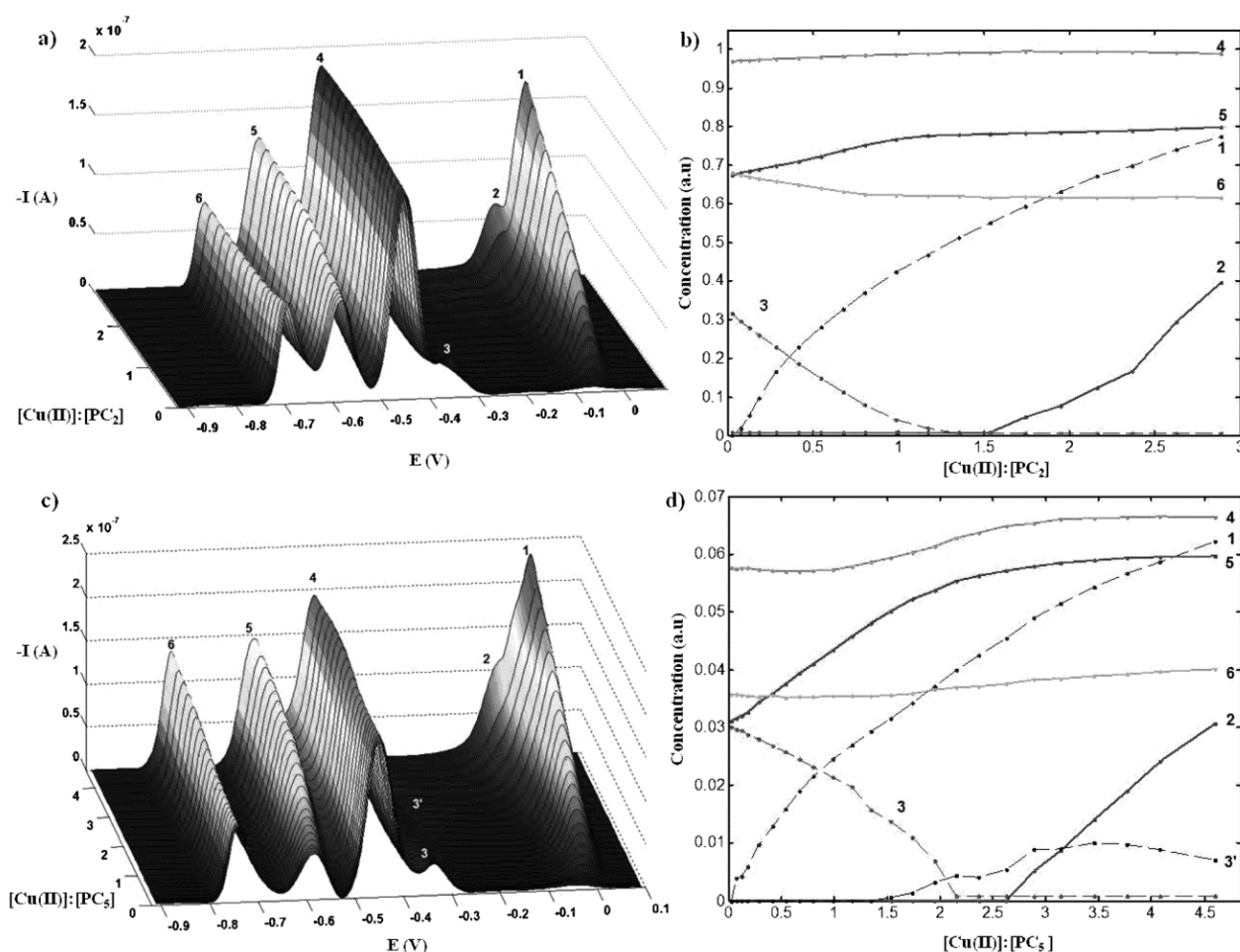


Fig. 3. Voltammograms obtained in the titration of (a) 2:2:1 $Cd^{2+}:Pb^{2+}:PC_2$ and (c) 3:2:1 $Cd^{2+}:Pb^{2+}:PC_5$ solutions (unitary concentration is $10 \mu mol L^{-1}$) with Cu^{2+} in $50 mmol L^{-1}$ BISTRIS buffer at pH 6.5. Concentration profiles b) and d) obtained from GPA analysis of data matrices a) and c) respectively. Components are: 1) anodic oxidation of Hg in the presence of Cu^{2+} complexes; 2) reduction of free Cu^{2+} ; 3 and 3') anodic signals of Hg in presence of $Cd(PC_{2,5})$ complexes and $Cu(PC_5)$ complexes, respectively; 4) reduction of free Pb^{2+} and overlapping anodic signals; 5) reduction of free Cd^{2+} ; 6) overlapping of the reduction of metals in $Cd(PC_{2,5})$ and $Cu(PC_{2,5})$ complexes.

ratios (Table S1 in SI). Cu^{2+} can form complexes with PC_2 such as $CuPC_2$ and Cu_2PC_2 , where binding occurs through thiol groups, but also as Cu_3PC_2 where carboxylate can play a role, maybe due to the small size of Cu^{2+} and the high affinity of Cu^{2+} towards carboxylic groups. At low PC_2 ratios only $CuPC_2$ and $CuCdPC_2$ complexes are observed. At increasing $PC_2:M^{2+}$ ratios, $CdPC_2$ complexes begin to appear including $CdPbPC_2$. At higher PC_2 ratios, where Cd^{2+} and Cu^{2+} are extensively complexed, even $PbPC_2$ complexes are formed (Figure 4).

The second set of experiments concerned PC_5 . For Cu^{2+} , $CuPC_5$, Cu_2PC_5 , Cu_3PC_5 , Cu_4PC_5 and Cu_5PC_5 were detected. At 1:1 $Cu^{2+}:PC_5$ ratio only $CuPC_5$, Cu_2PC_5 and $CuCdPC_5$ were observed. This shows that, although Cu^{2+} can form the complete series of complexes with PC_5 , the more stable ones are $CuPC_5$, Cu_2PC_5 and maybe Cu_3PC_5 , as shown by the ratio where the excess of Cu^{2+} appears in voltammetric experiments. As in the previous set, at increasing $PC_5:M_1:M_2:M_3$ ratios, first the Cd^{2+} complexes

appear, including the $CdPbPC_5$ complex, and finally, when Cd^{2+} and Cu^{2+} are complexed and excess of PC_5 is reached, Pb^{2+} complexes are formed.

4 Conclusions

We can conclude from the complexation study of these metals show that copper has more affinity than cadmium and lead. The voltammetric studies seem to show that Pb^{2+} is excluded from PC_n complexes when in the presence of both Cd^{2+} and Cu^{2+} . These results are confirmed by ESI-MS studies. Ternary complexes with PC_2 and PC_5 and quaternary with PC_5 were detected. The signal evolution for mixed $CdCuPC_n$ complexes is quite different and a dependence upon the number of thiol groups is verified. These observations could be a reflection of an antagonistic effect for the case of PC_2 and a synergetic one for PC_5 . It must be remarked that the formation of minority com-

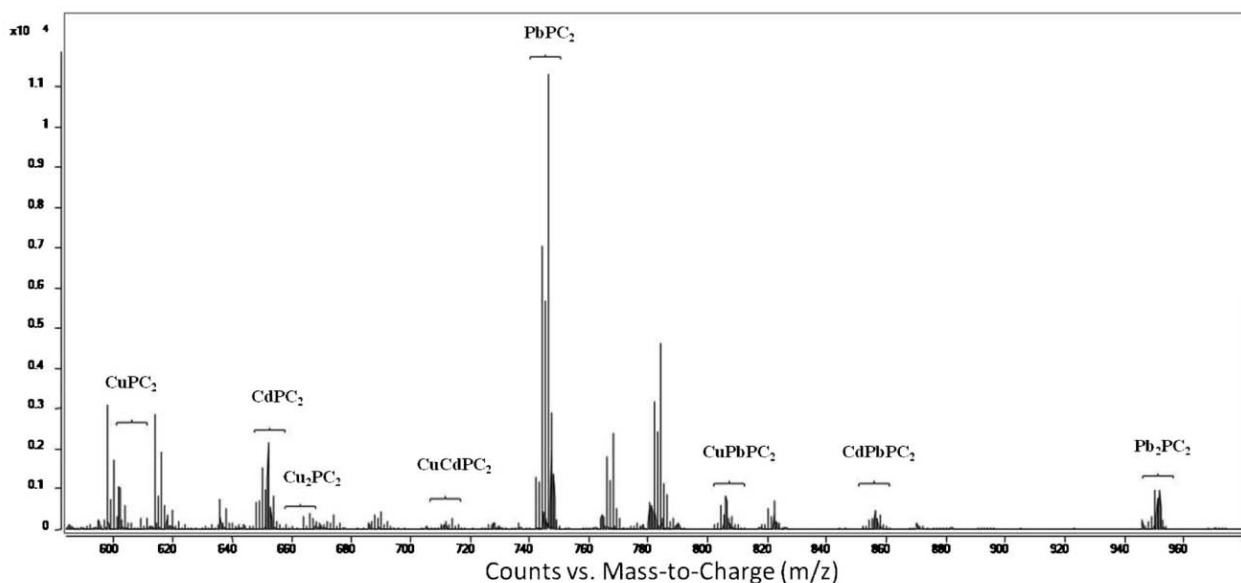


Fig. 4. Positive mode ESI-MS spectrum for a 1:1:1:4 $\text{Cu}^{2+}:\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}:\text{PC}_2$ sample in the direct injection of 50 μL , in $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{NH}_4\text{OH}$ buffer (pH 6.5), at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} with an applied cone potential of 350 V.

plexes for PC_5 is higher than for PC_2 , and their ESI-MS detection is much more complicated owing all complexes that can appear and all their fragments. Therefore, uncertainty for PC_5 results is higher than for PC_2 . However, we can conclude that ESI-MS confirm the main voltammetric results concerning the behavior of Cd^{2+} , Cu^{2+} and Pb^{2+} in the presence of different PC_2 or PC_5 ratios.

Supporting Information

Supporting information available: (S1) Complexation of Zn^{2+} by PC_5 ; (S2) Competitive Complexation of Cu^{2+} and Pb^{2+} by PC_5 ; (S3) Competitive Complexation of Cd^{2+} and Cu^{2+} by PC_2 ; (S4) Competitive Complexation of Ternary Metal Mixture by PC_n ; (S5) Study by ESI-MS.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471). Rui Gusmão and Santiago Cavanillas are grateful to MICINN for their Ph.D. grants (BES-2007-15385 and BES-2010-032352).

References

- [1] S. Susarla, V. F. Medina, S. C. McCutcheon, *Ecol. Eng.* **2002**, *18*, 647.
- [2] N. K. Hannink, S. J. Rosser, N. C. Bruce, *Crit. Rev. Plant. Sci.* **2002**, *21*, 511.
- [3] M. B. Kirkham, *Geoderma* **2006**, *137*, 19.
- [4] J. Yoon, X. Cao, Q. Zhou, L. Q. Ma, *Sci. Total Environ.* **2006**, *368*, 456.
- [5] H. C. Chiang, J. C. Lo, K. C. Yeh, *Environ. Sci. Technol.* **2006**, *40*, 6792.
- [6] S. Cherian, M. M. Oliveira, *Environ. Sci. Technol.* **2005**, *39*, 9377.
- [7] M. W. H. Evangelou, M. Ebel, A. Schaeffer, *Chemosphere* **2007**, *68*, 989.
- [8] M. J. Buchauer, *Environ. Sci. Technol.* **1973**, *7*, 131.
- [9] Y. Osaki, T. Shirabe, H. Nakanishi, T. Wakagi, E. Yoshimura, *Metallomics* **2009**, *1*, 353.
- [10] L. Wei, J. R. Donat, G. Fones, B. A. Ahner, *Environ. Sci. Technol.* **2003**, *37*, 3609.
- [11] C. Cobbett, P. Goldsbrough, *Annu. Rev. Plant Biol.* **2002**, *53*, 159.
- [12] R. K. Mehra, V. R. Kodati, R. Abdullah, *Biochem. Biophys. Res. Co.* **1995**, *215*, 730.
- [13] R. Gusmão, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Biochem.* **2010**, *406*, 61.
- [14] M. Fojta, M. Fojtová, L. Havran, H. Pivoňková, V. Dorčák, I. Šestáková, *Anal. Chim. Acta* **2006**, *558*, 171.
- [15] V. Dorčák, I. Šestáková, *Bioelectrochemistry* **2006**, *68*, 14.
- [16] 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, *Sensors* **2007**, *7*, 932.
- [17] M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, in S. Brown, R. Tauler, R. Walczak, *Comprehensive Chemometrics*, Vol. 4, Oxford University Press, Oxford **2009**, pp. 425–458.
- [18] S. Cavanillas, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Chim. Acta* **2011**, *689*, 198.
- [19] E. Chekmeneva, R. Prohens, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* **2008**, *42*, 2860.
- [20] R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 9006.
- [21] M. F. C. Leal, C. M. G. van den Berg, *Aquat. Geochem.* **1998**, *4*, 49.
- [22] R. K. Mehra, P. Mulchandani, *Biochem. J.* **1995**, *307*, 697.
- [23] T. W. Yen, J. V. Villa, J. G. DeWitt, *J. Mass Spectrom.* **1999**, *34*, 930.

SUPPORTING INFORMATION

Voltammetric analysis of phytochelatin complexation in ternary metal mixtures supported by multivariate analysis and ESI-MS

Santiago Cavanillas, Rui Gusmão, 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. Email: cristina.arino@ub.edu

Contents:

- S1. Complexation of Zn^{2+} by PC_5 .
- S2. Competitive Complexation of Cu^{2+} and Pb^{2+} by PC_5 .
- S3. Competitive Complexation of Cd^{2+} and Cu^{2+} by PC_2 .
- S4. ESI-MS Results.

RESULTS AND DISCUSSION

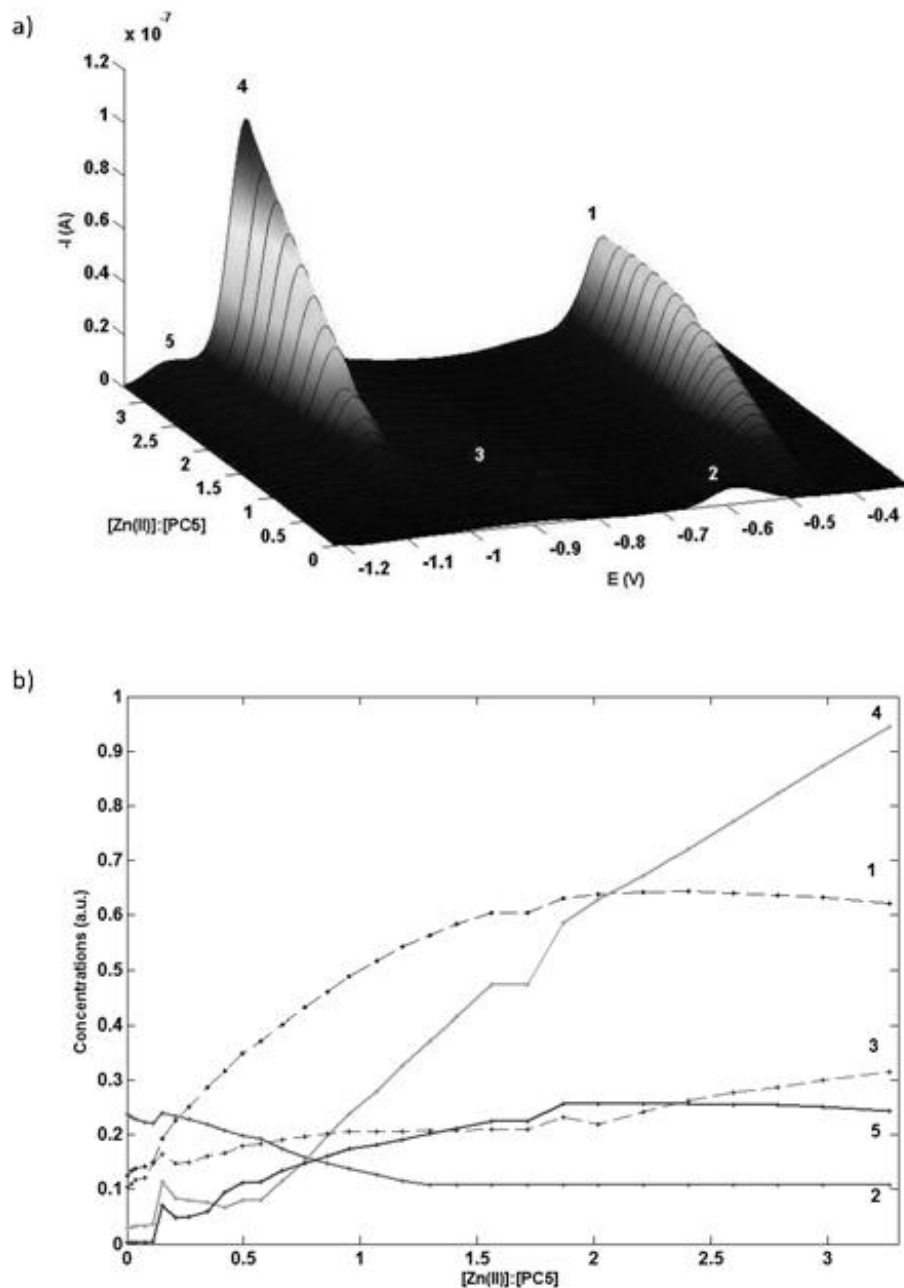
S1. Complexation of Zn^{2+} by PC_5 

Figure S1 a) Voltammograms obtained in the titration of $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ PC_5 with Zn^{2+} in BISTRIS buffer at pH 6.5.

Components assignments: 1, 3 - anodic oxidation of Hg in the presence of Zn/PC_5 complex; 2- anodic oxidation of Hg in the presence of free PC_5 ; 4- reduction of free Zn^{2+} ; 5- reduction of Zn^{2+} in Zn/PC_5 complex. b) Concentration profiles obtained by GPA program from data in a).

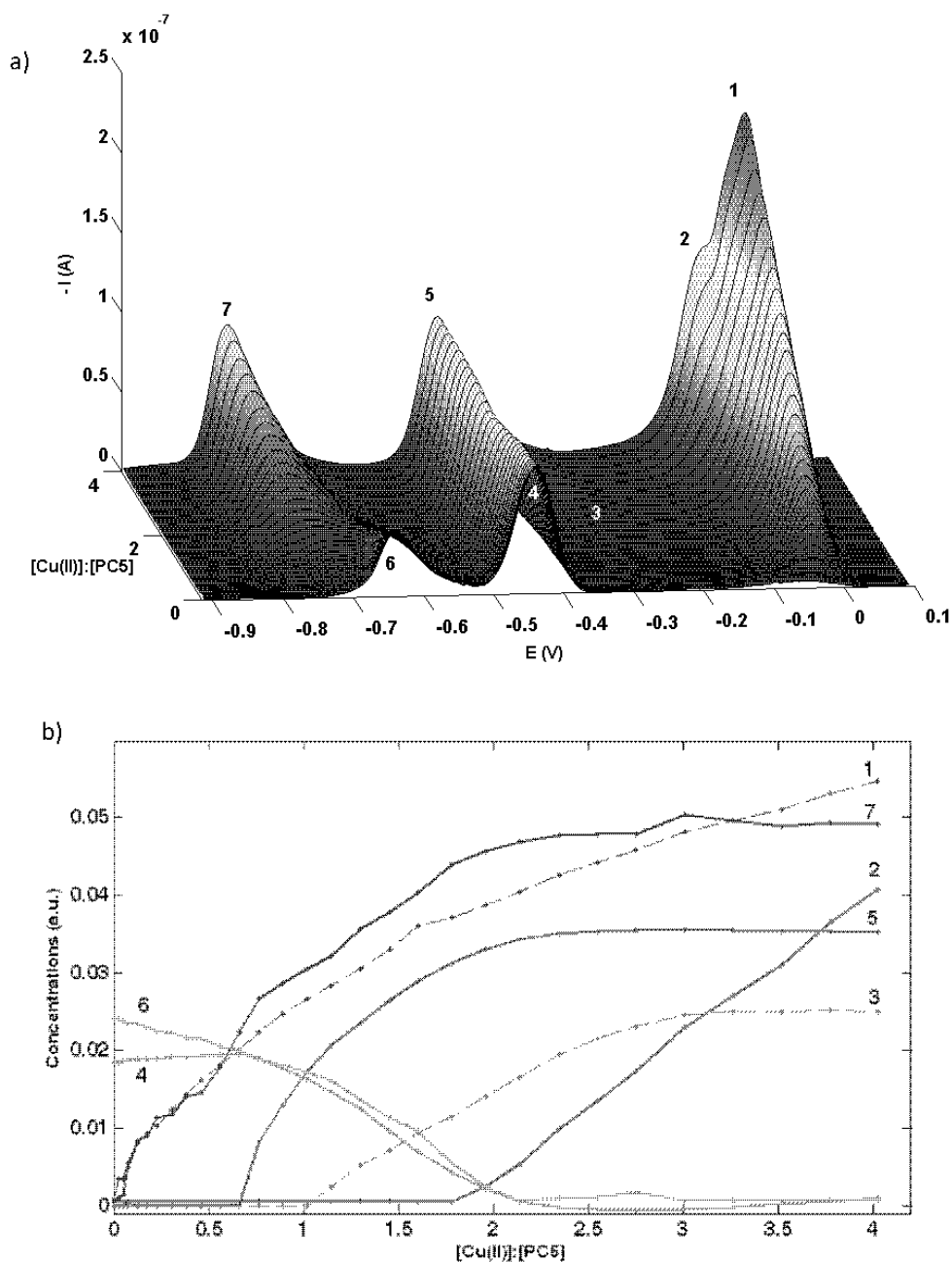
S2. Competitive Complexation of Cu^{2+} and Pb^{2+} by PC_5


Figure S2. a) Voltammograms obtained in the titration of 1:1 $\text{Pb}^{2+}:\text{PC}_5$ $10 \mu\text{mol L}^{-1}$ with Cu^{2+} in BISTRIS buffer at pH 6.5. Components assignments: 1 - Anodic oxidation of Hg in the presence of Cu^{2+} complexes; 2- Reduction of free Cu^{2+} ; 3- Reduction of Cu^{2+} in a weak CuPC_5 complex; 4- Anodic oxidation of Hg in the presence of Pb^{2+} complexes; 5- Reduction of free Pb^{2+} ; 6 - Reduction of Pb^{2+} in $\text{Pb}(\text{PC}_5)$ complexes; 7 - Reduction of Cu^{2+} in $\text{Cu}(\text{PC}_5)$ complexes. b) Concentration profiles obtained by GPA program from data in a).

S3. Competitive Complexation of Cd^{2+} and Cu^{2+} by PC_2

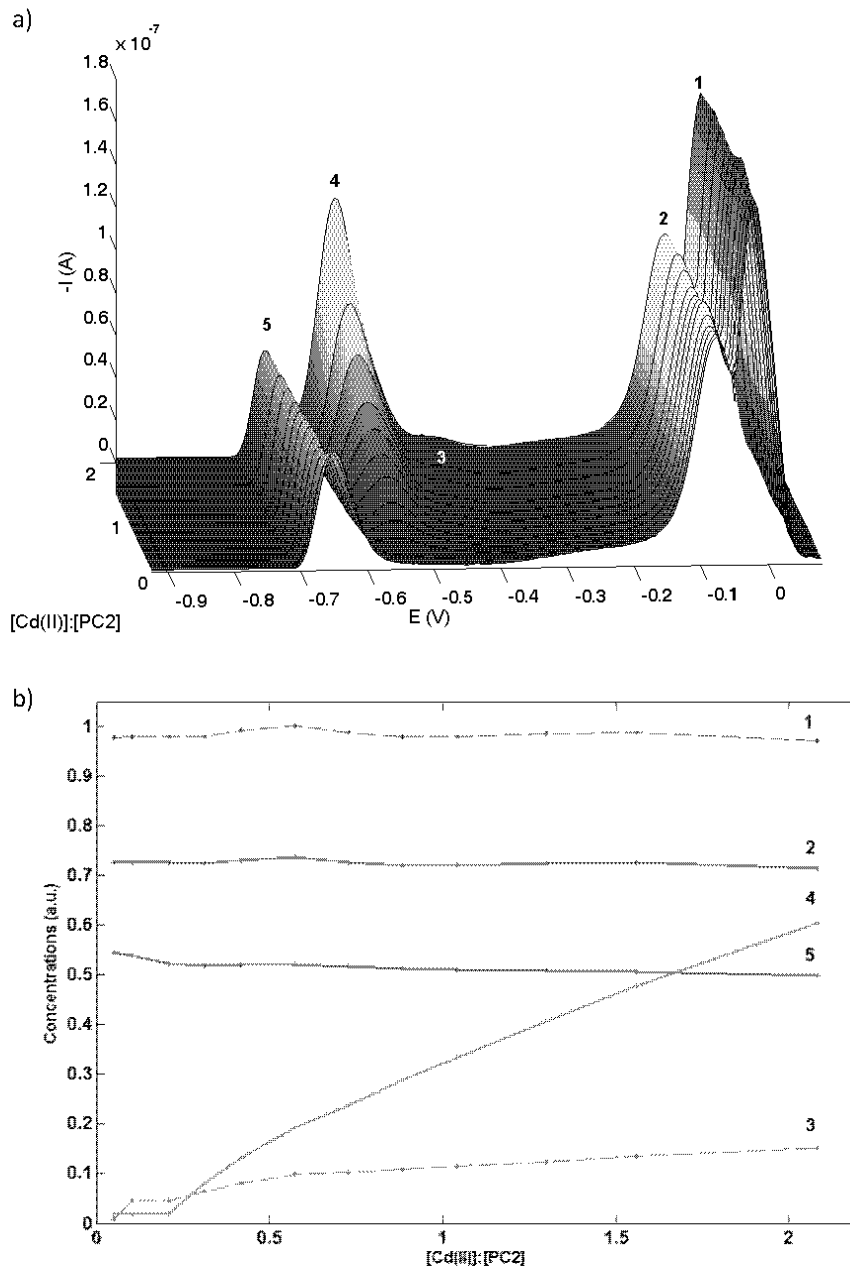


Figure S3. a) Voltammograms, obtained in the titration of 3:1 $\text{Cu}^{2+}:\text{PC}_2$ (unitary concentration $10 \mu\text{mol L}^{-1}$) with Cd^{2+} in BISTRIS buffer at pH 6.5. Components assignments: 1 - Anodic oxidation of Hg in the presence of Cu^{2+} complexes; 2- Reduction of free Cu^{2+} ; 3 - Reduction of Cu^{2+} in a weak CuPC_2 complex; 4- Reduction of free Cd^{2+} ; 5 – Reduction of Cu^{2+} in the PC_2 complexes. b) Concentration profiles obtained by GPA program from data in a).

S4. ESI-MS Results

Table S1. Metal – phytochelatin complexes signals detected by positive mode ESI-MS at different metals:PC_n ratios. Experimental conditions: direct injection of 50µl, in 2x10⁻² mol L⁻¹ CH₃COONH₄/NH₄OH buffer (pH 6,5), at a flow rate of 0.1 mL min⁻¹ with an applied cone potential of 350 V.

Solution	tritant [PCs]	Cd:Pb:Cu:PCn	Complexes	m/z
PC ₅	2.5·10 ⁻⁵ PC ₅		PC ₅	1236
Cu ²⁺	5·10 ⁻⁵ PC ₅	0:0:1:2	Cu ₂ PC ₅ Cu ₃ PC ₅ Cu ₄ PC ₅ Cu ₅ PC ₅	1362 1424 1486 1550
Cu ²⁺ + Cd ²⁺ + Pb ²⁺	5·10 ⁻⁵ PC ₅	1:1:1:1	Cu ₂ PC ₅ CdPC ₅ CuCdPC ₅ Cu ₂ CdPC ₅ Cu ₃ CdPC ₅	1362 1348 1408 1472 1535
Cu ²⁺ + Cd ²⁺ + Pb ²⁺	10 ⁻⁴ PC ₅	1 : 1 : 1 : 2	CdPC ₅ PbPC ₅ Pb ₂ PC ₅ CdPbPC ₅ Cu ₂ CdPC ₅ CuCdPC ₅	1348 1442 1648 1552 1472 1408
Cu ²⁺ + Cd ²⁺ + Pb ²⁺	1.5·10 ⁻⁴ PC ₅	1 : 1 : 1 : 3	CdPC ₅ PbPC ₅ Pb ₂ PC ₅ CuCdPC ₅ Cu ₂ CdPC ₅ CdPbPC ₅ CdPbCuPC ₅	1348 1442 1648 1410 1472 1552 1616
PC ₂	2.5·10 ⁻⁵ PC ₂		PC ₂	540
Cu ²⁺	5·10 ⁻⁵ PC ₂	0:0:1:2	Cu ₂ PC ₂ Cu ₂ PC ₂ Cu ₃ PC ₂	602 664 726
Cu ²⁺ + Cd ²⁺ + Pb ²⁺	5·10 ⁻⁵ PC ₂	1:1:1:1	CuPC ₂	602

			Cu_2PC_2	664
			CuCdPC_2	710
$\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$	10^{-4}PC_2	1 : 1 : 1 : 2	CuPC_2	602
			Cu_2PC_2	664
			CuCdPC_2	710
$\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$	$1.5 \cdot 10^{-4} \text{PC}_2$	1 : 1 : 1 : 3	CuPC_2	602
			Cu_2PC_2	664
			CdPC_2	652
			CuCdPC_2	710
			CdPbPC_2	856
$\text{Cu}^{2+} + \text{Cd}^{2+} + \text{Pb}^{2+}$	$2 \cdot 10^{-4} \text{PC}_2$	1 : 1 : 1 : 4	CuPC_2	602
			Cu_2PC_2	664
			CdPC_2	652
			PbPC_2	746
			Pb_2PC_2	952
			CuCdPC_2	710
			CuPbPC_2	806
			CdPbPC_2	856

9.3. Electroanalytical and isothermal calorimetric study of As(III) complexation by the metal poisoning remediators, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid.

Santiago Cavanillas, Elena Chekmeneva, Cristina Ariño, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban.

Analytica Chimica Acta 746 (2012) 47–52.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Analytica Chimica Acta

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



Electroanalytical and isothermal calorimetric study of As(III) complexation by the metal poisoning remediators, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid

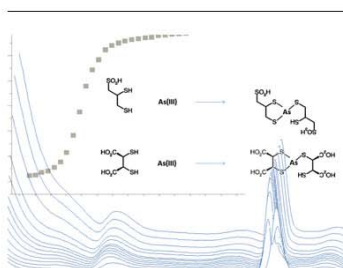
Santiago Cavanillas, Elena Chekmeneva¹, Cristina Ariño*, José Manuel Díaz-Cruz, Miquel Esteban

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

HIGHLIGHTS

- ▶ A voltammetric approach is applied to the study of As(III) complexation by poisoning remediators.
- ▶ Voltammetry measurements are complemented with Isothermal Titration Calorimetry (ITC) and Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS).
- ▶ Voltammetric data are analyzed by Gaussian Peak Adjustment (GPA) method.

GRAPHICAL ABSTRACT



ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 March 2012
Received in revised form 20 July 2012
Accepted 3 August 2012
Available online 14 August 2012

Keywords:

2,3-Dimercapto-1-propanesulfonate
Meso-2,3-dimercaptosuccinic acid
Arsenic
Voltammetry
Isothermal Titration Calorimetry
Multivariate Curve Resolution

ABSTRACT

A recently developed methodology, which combines voltammetry, ITC, ESI-MS and several chemometric tools, has been applied for the first time to the study of As(III) complexes. The ligands considered, DMSA and DMPS, are commonly used to treat heavy metal poisoning. The study yields a reliable and consistent picture of the binding of As(III) by the chelating therapy agents DMSA and DMPS providing an unambiguous description of the stoichiometries of the complexes (ML₂, with the occasional appearance of ML in the case of DMSA), both ligands have stability constants of the same order, with a log β₂ of 9.2 and 9.8, respectively. These values confirm the potential efficiency of both ligands in the treatment of As(III) poisoning.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Arsenic toxicity and its association with human diseases such as blackfoot disease, diabetes, hypertension and some kinds of cancers have been widely considered in the literature. It is well known that arsenic can be present in the environment as arsenate (As(V)), arsenite (As(III)), monomethylarsonic acid, dimethylarsinic

acid, arsenobetaine and arsenosugar, all of which have different degrees of mobility, bioavailability and toxicity. Nowadays, arsenic can be found in certain water supplies, seafood, glues, pigments and cigarette smoke. In places where geological structure introduces arsenic in water, which includes North of Chile, Bangladesh among others, drinking water contamination is a serious problem [1–3].

Some chelating agents are used for the remediation of As poisoning. Of which sodium 2,3-dimercaptopropanesulfate (DMPS) and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) are the most usual [4–7]. These compounds include in their structure thiol groups that have a large capacity to complex several metals and metalloids.

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

E-mail addresses: cristina.arino@ub.edu, cristina@apolo.qui.ub.es (C. Ariño).

¹ Present address: Department of Chemistry, University of Sheffield, Sheffield S3 7HF, United Kingdom.

Some recent works have focused on the complexation of the chelating agents DMSA and DMPS with Hg^{2+} followed by electroanalytical techniques [8]. Other studies of complexation of As(III) with DMSA have been carried out by thermodynamic analysis, by near-UV spectroscopy and by Isothermal Titration Calorimetry (ITC), providing detailed information on the As(III)–thiol interaction [9]. Nevertheless, the lack of enough information in the literature dealing with As(III) complexation by DMPS prompted us to conduct a voltammetric study of this system applying a novel approach combining an electrochemical method and the chemometrical analysis of data. The study was carried out by Differential Pulse Polarography (DPP) which allows working at lower concentration levels than in previous studies. In order to validate the approach, the complexation of As(III) by DMSA was revisited and the results (stoichiometries and the stability constants of the complexes) were compared with previous findings [9].

In a first attempt, several trials with a gold electrode were carried out due to its spread use for the determination of As(III) using different electroanalytical techniques [10]. However, thiol groups of the chelating agents had more affinity for the Au electrode surface than for complexation in solution. To overcome this problem, the systems were studied using a Hg electrode and DPP as the voltammetric measuring technique. Although the signals related with the reduction of arsenic complexes do not appear in the voltammograms (they are hidden by the hydrogen discharge), the literature indicates that the anodic signals related to the interaction between the complexes and the Hg electrode are clearly visible (they appear at less negative potential values than hydrogen discharge) and can be useful to understand the complexation of As(III) [11,12].

The data obtained by DPP were analyzed by Multivariate Curve Resolution using Gaussian Peak Adjustment (GPA) method, and exceptionally by Alternating Least Squares (MCR-ALS) for the non-peak-shaped part of the data matrix, which corresponds to the free As(III) signal. This method has been successfully applied to voltammetric data in previous works [12–14]. The voltammetric results were complemented and compared with new ITC data, and with other data described elsewhere [9]. Electro spray Ionization Mass Spectrometry (ESI-MS) revealed the stoichiometries and relative stability of the complexes.

2. Experimental

2.1. Chemicals and instrumentation

Analytical grade meso-2,3-dimercaptosuccinic acid (DMSA), and sodium 2,3-dimercaptopropanesulfate (DMPS) were purchased from Sigma/Aldrich. The chelating agent solutions were prepared daily. To ensure homogeneity, solutions were mixed using Eppendorf Mixmate. Standard solutions of As(III) were prepared by dissolving As_2O_3 (Merck) in the minimum amount of NaOH, adjusting the pH to about 3.5 with HCl, and diluting with H_2O .

All other reagents were analytical grade. Phosphate buffer saline (PBS) at pH 7.4 was prepared from Na_2HPO_4 (Aldrich) and $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Scharlau). For ITC experiments, HEPES (Sigma) buffer at pH 7.4 was chosen. For ESI-MS experiments, acetonitrile (HPLC grade) was used. Ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 water purification system) was employed in all experiments. All the experiments were carried out at 25 °C, and purified nitrogen was used for solution deaeration.

Differential pulse polarography (DPP) was performed using a Metrohm-757 VA Computrace attached to a personal computer with data acquisition software (Metrohm). Working, reference and auxiliary electrodes were static mercury drop electrode (SMDE), Ag/AgCl, KCl (3 mol L⁻¹), and a glassy carbon rod respectively

(Metrohm). Double distilled Hg was used. ESI-MS experiments in positive mode for the mixtures containing thiol ligands and As(III) were performed using a Q-TOF Agilent 1100 instrument with direct injection of the sample. Calorimetric measurements were carried out with VP-ITC MicroCal titration calorimeter. pH measurements were carried out using an Orion SA 720 pH-meter.

2.2. Procedures

2.2.1. Voltammetric titrations

Measurements were performed by DPP at 5×10^{-2} mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS) pH 7.4. In each case, 20 mL of 2×10^{-5} mol L⁻¹ starting solution of As(III), DMSA or DMPS was placed in the voltammetric cell. Instrumental parameters for DPP experiments were as follows: voltage step of 5 mV, pulse amplitude of 50 mV, pulse time of 0.05 s, drop time of 1 s and sweep rate of 50 mV s^{-1} . After deaerating the solution with pure N_2 for 20 min, DP polarograms were recorded. Subsequently, successive additions of 10^{-2} As(III) or 2×10^{-3} mol L⁻¹ DMSA or DMPS solution were made. After each addition, the solution was purged with N_2 , mechanically stirred for 1 min and the polarograms were recorded. Data were corrected for dilution effects.

2.2.2. Electro spray Ionization Mass Spectrometry experiments

In ESI-MS experiments, direct injections of 50 μL of the sample, in 2×10^{-2} mol L⁻¹ ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer (pH 7.4), in a 1:9 acetonitrile: 5×10^{-3} mol L⁻¹ ammonium acetate mixture (pH 7.4) solvent were carried out at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} . Source and desolvation temperatures were 150 °C and 300 °C respectively. The applied capillary voltage was 3.5 kV, and the cone potential was optimized at 200 V. The mass spectra were collected over an m/z range from 100 to 2000. Instrumental control, mass spectra deconvolution and analysis were performed using MassHunter Workstation Software (B.02.00).

2.2.3. Isothermal Titration Calorimetry

ITC measurements were carried out at 25 °C as follows: the solution of As(III) or ligand (DMSA or DMPS) in 0.02 mol L^{-1} HEPES buffer pH 7.4 was placed in the cell, and automatic titration of As(III) was then performed with DMSA or DMPS (or *vice versa*), in the same buffer. A typical ITC measurement was carried out as reported elsewhere [14]. The fitting of ITC data to different binding models using the nonlinear least-squares approach (Levenberg–Marquardt algorithm) was performed with MicroCal Origin software [15].

2.2.4. Data treatment

Voltammograms were first converted into data matrices using homemade programs implemented in MATLAB [16], smoothed and baseline corrected. MCR-ALS analysis of data was carried out using several programs also implemented in MATLAB (some of which are available at <http://www.ub.edu/mcr/download.htm>), following the general methodology described in previous papers [13,17]. Among them, the Gaussian Peak Adjustment (GPA) program [18] was applied to correct peak movement and broadening along the experiment (http://www.ub.edu/dqaelc/programas_eng.html). In the treatment of electrochemical measurements, the concept of “component” in MCR-ALS or GPA refers to the signal from an electrochemical process and not to a chemical species, as in spectroscopic data.

3. Results and discussion

3.1. Voltammetric experiments

In order to study the complexation of arsenic with DMSA and DMPS, voltammetric titrations in PBS pH 7.4 were performed. The

obtained data were analyzed chemometrically by MCR-ALS and GPA.

3.1.1. As(III)–DMSA system

Fig. 1a shows the voltammograms obtained for titration of As(III) with DMSA. Initially, a small signal (not peak-shaped) related to free As(III) appears at ca. -1.6 V. After DMSA additions, five different signals are observed. These signals are related to the anodic oxidation of the Hg electrode and they are typically observed in complexation studies with thiol-containing ligands [11]. Of these, the signal at -0.6 V is of particular interest indicating the presence of free DMSA (component 2). The other signals are related to the complexes formed in the solution, being signal 3 the most relevant.

When chemometrics is applied to the data matrix from Fig. 1a, the concentration profiles presented in Fig. 1b are obtained. With the first DMSA addition, four anodic signals (components 1, 3, 4, and 5) related to the formation of complexes appear and change along the titration. Simultaneously, the signal of As(III) (component 6) decreases, although it is not possible to indicate unequivocally at what DMSA/As(III) ratio it reaches the base level (likely at ca. 2) due to its undefined shape. The signal related to the free DMSA (component 2) is significant from a DMSA/As(III) ratio of ca. 1, when signal 5 reaches its maximum value. Signal 5 seems to be related to the formation of the 1:1 complex. The most relevant anodic signal related to As(III) complexes (component 3) increases from the beginning of the titration and stabilizes at a DMSA/As(III) ratio

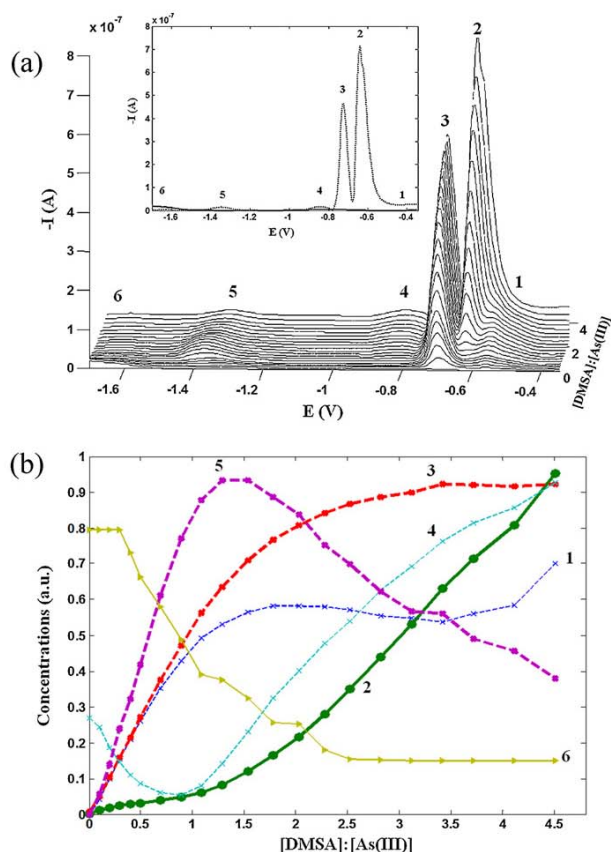


Fig. 1. (a) DPP curves for the titration of As(III) solution with DMSA in PBS pH 7.4. Inset: the first (—) and the last (---) voltammograms of the titration. (b) Concentration profiles obtained by GPA. Components: 1, 3, 4, and 5, anodic signals related with the arsenic complexes; 2, anodic oxidation of Hg in the presence of free DMSA; 6, reduction of free As(III).

of ca. 2. These results indicated that the ML complex is formed first, whereas the ML_2 complex predominates at higher DMSA concentrations; furthermore, they confirm the findings previously obtained by other analytical techniques at higher concentration levels [9].

3.1.2. As(III)–DMPS system

To the best of our knowledge, no previous data have been reported for this system. The voltammograms obtained from the addition of As(III) to DMPS solution are shown in Fig. 2a. For the sake of simplicity, a nomenclature similar to the previous case has been used. Initially, the plot shows the peak of the free DMPS (component 2). When As(III) is added this peak decreases, and four anodic signals related to As(III) complexes appear (components 1, 3, 4, and 5). Finally, the free As(III) signal (not peak-shaped, component 6) appears.

Fig. 2b shows that the concentration profile of free DMPS (component 2) decreases with As(III) additions until reaching a As(III)/DMPS ratio of ca. 0.5 when it stabilizes indicating the formation of the ML_2 complex. However, there is some ambiguity in the data treatment due to the overlapping of this peak with the anodic signal related to the arsenic complex (component 3). Nevertheless, monitoring of three anodic signals (components 1, 4, and 5) allows us to confirm this point since these peaks reach their maximum value at the same ratio, whereas the signal of free As(III)

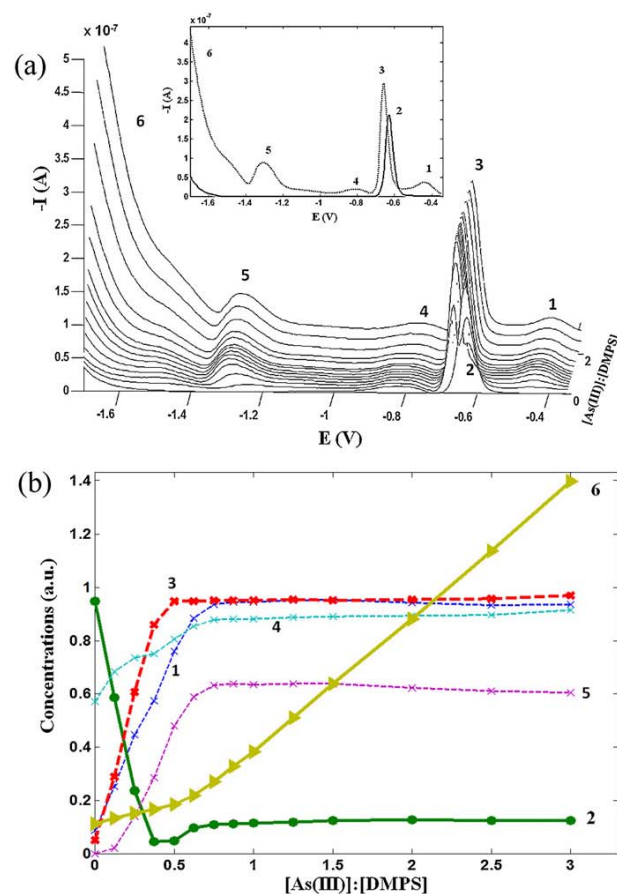


Fig. 2. (a) DPP curves for the titration of DMPS solution with As(III) in PBS pH 7.4. Inset: the first (—) and the last (---) voltammograms of the titration. (b) Concentration profiles obtained by GPA. Components: 1, 3, 4, and 5, anodic signals related with the arsenic complexes; 2, anodic oxidation of Hg in the presence of free DMPS; 6, reduction of free As(III).

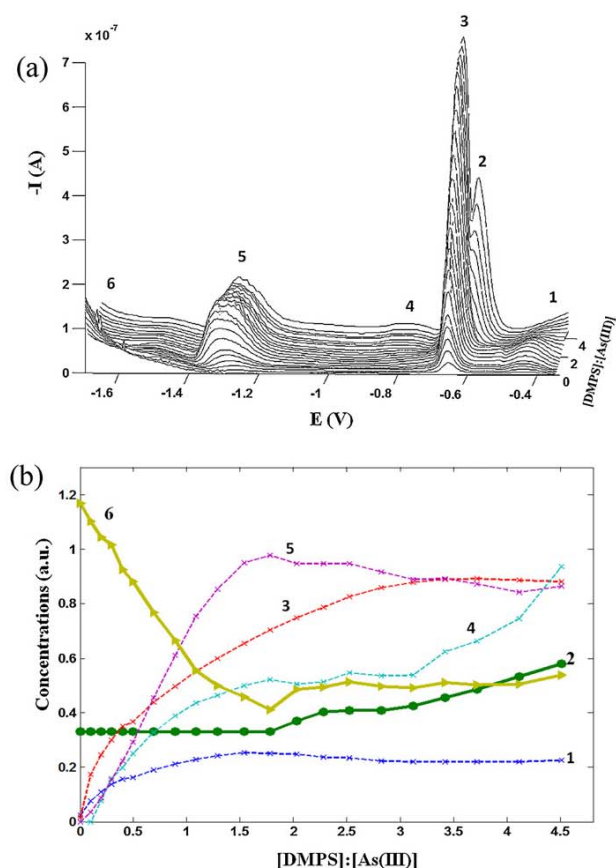


Fig. 3. (a) DPP curves for the titration of As(III) solution with DMPS in PBS pH 7.4. (b) Concentration profiles obtained by GPA. Components: 1, 3, 4, and 5, anodic signals related with the arsenic complexes; 2, anodic oxidation of Hg in the presence of free DMPS; 6, reduction of free As(III).

(component 6) starts to increase, suggesting that the $\text{As}(\text{DMPS})_2$ complex is the most stable.

The voltammograms of the direct titration of As(III) with DMPS are shown in Fig. 3a. Initially, only the arsenic free signal (component 6) is present. However, when DMPS is added, four anodic signals (components 1, 3, 4, and 5) appear which are related to the complexes formed in solution. They increase and further stabilize, when the anodic signal of free DMPS (component 2) appears, as it happened in the case of direct titration of the DMSA system.

The data were treated chemometrically, yielding the concentration profiles presented in Fig. 3b. The free arsenic signal (component 6) decreases until reaching a DMPS/As(III) ratio of 2, indicating the formation of the ML_2 complex. The maximum values of the anodic signals of the complexes are reached at a relatively uncertain ratio, but they do not indicate a significant formation of the ML complex. The use of GPA allows us to solve the overlapping with the anodic signal related to the free ligand and the arsenic complexes

(component 2 and 3, respectively). The appearance of the DMPS signal was then clearly observed at a ratio of 2, indicating the formation of only one predominant complex ML_2 .

3.2. Isothermal Titration Calorimetry experiments

The main advantage of ITC is its ability to characterize any type of interaction by providing, in one experiment, the values of complex stoichiometry (n), stability constant (K), and the enthalpy (ΔH) of an interaction. In the present study, ITC was applied to obtain the thermodynamic parameters for As(III)–DMSA and –DMPS systems. Table 1 shows the best fit parameters (averaged from more than 3 replicates) obtained for the experimental curves. Table 1 also gives the β_2 values obtained as the product $K_1 \times K_2$ for the sequential binding sites model or K_1^2 for the one set of sites model.

3.2.1. As(III)–DMSA system

The ITC measurements for the DMSA–As(III) system (results not shown) were run in both direct and reverse modes (placing As(III) into the working cell or into the injector respectively). ITC data from As(III) additions to DMSA show only one inflection in the titration curve, at ca. 0.5 As(III)/DMSA ratio, thus indicating the formation of the ML_2 complex. The reverse titration of As(III) with DMSA shows an initial exothermic process indicating the formation of the ML complex. After further DMSA additions, an exothermic inflection in the titration curve, at ca. 2 DMSA/As(III) ratio, confirms the formation of the more stable ML_2 complex. These results agree with previously reported findings [9].

3.2.2. As(III)–DMPS system

The complexation of As(III) with DMPS was also studied by ITC (Table 1). The additions of As(III) to DMPS yield a curve (Fig. 4a) with one inflection at the As(III)/DMPS ratio of 0.5, indicating the formation of the ML_2 complex, as in the case of the As(III)–DMSA system. The formation of ML_2 as the most stable complex is also supported by the results of the titration of As(III) by DMPS (Fig. 4b), which show an inflection point at the ratio of 2. For both systems, As(III)–DMSA and –DMPS, the stability constants are of the order of 10^5 mol L^{-1} , and the most stable complex is ML_2 . Considering the proximity of enthalpy and entropy values for the interactions, it can be concluded that the complexation is entropically driven because of the favorable ΔH value, which is opposed by the loss of entropy. More favorable entropy values observed in the reverse titrations (As(III) titrated with DMSA and DMPS) might be the result of ligand dilution when added into the working cell.

3.3. Electrospray Ionization Mass Spectrometry experiments

Direct injection ESI-MS has been used to confirm the stoichiometries of the complexes proposed from previous data. The As(III)/DMSA system was studied by direct injection of some samples with different As(III)/DMSA ratios. The complexes found are As(DMSA) (254.87 m/z) and As(DMSA) $_2$ (428.88 m/z). These results confirm the 1:1 and 1:2 stoichiometries proposed by voltammetric and ITC experiments.

Table 1
Thermodynamic parameters fitted in the titrations of the As(III)–(DMSA or DMPS) system.

Titration	Site (N)	$K_1 \cdot 10^{-5} (\text{M}^{-1})$	$\log \beta_2$	$\Delta H (\text{Kcal mol}^{-1})$	$\Delta S (\text{cal (mol K)}^{-1})$	Fitting model
As(III) to DMSA	0.48 ± 0.01	0.79 ± 0.05	9.80	-9.21 ± 0.08	-8.46	One set of sites
DMSA to As(III)	First	0.53 ± 0.03		-7.74 ± 0.06	-4.27	Sequential binding sites
	Second	0.30 ± 0.09	9.20	-13.55 ± 0.09	-25.0	
As(III) to DMPS	0.51 ± 0.01	2.20 ± 0.14	10.68	-11.11 ± 0.54	-12.7	One set of sites
DMPS to As(III)	1.95 ± 0.02	0.84 ± 0.06	9.85	-12.07 ± 0.11	-17.9	One set of sites

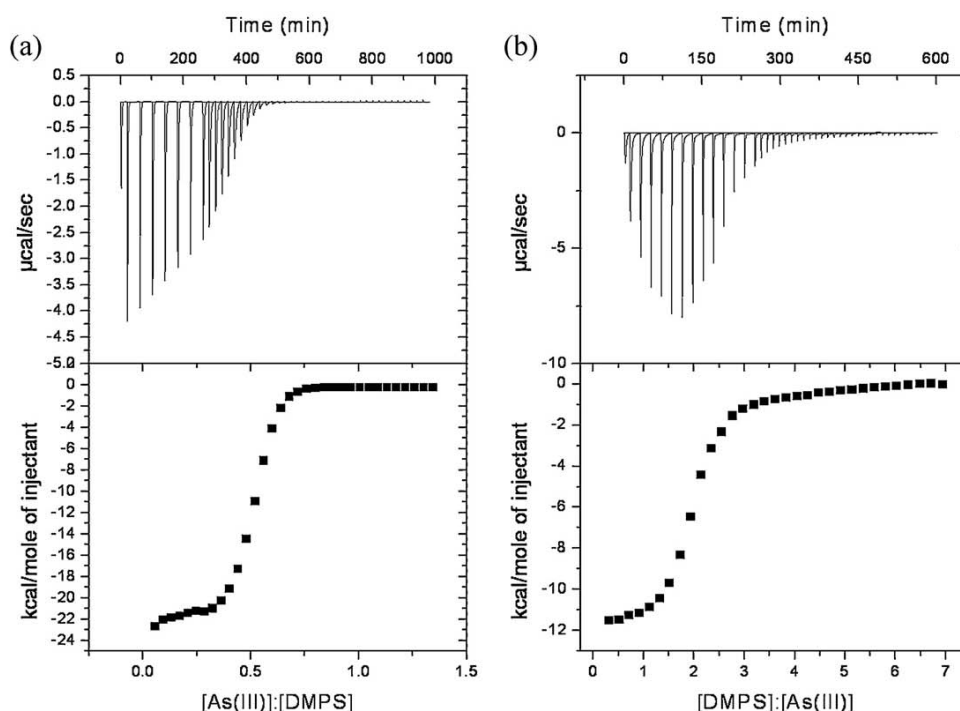


Fig. 4. (a) ITC data of a titration of DMPMS (0.5 mM) with As(III). (b) ITC data of a titration of As(III) (0.2 mM) with DMPMS. The best fit parameters are reported in Table 1.

Table 2

Summary table of all the species at different L/As(III) ratios for the two ligands and by the three techniques.

Ligand	Species detected at different L/As(III) ratios			Predominant species
	L/As(III) < 1	1 < L/As(III) < 2	L/As(III) > 2	
DMSA	As(DMSA) ₂ ^c As(DMSA) ^{a,b,c}	As(DMSA) ₂ ^{a,b,c} As(DMSA) ^{a,b,c}	As(DMSA) ₂ ^{a,b,c} As(DMSA) ^c	As(DMSA) ₂ ^b
DMPS	As(DMPS) ₂ ^{a,b,c} As(DMPS) ^c	As(DMPS) ₂ ^{a,b,c} As(DMPS) ^c	As(DMPS) ₂ ^{a,b,c}	As(DMPS) ₂ ^{a,b}

^a DPP.

^b ITC.

^c ESI-MS.

By applying a similar procedure to the As(III)/DMPS system, the As(DMPS)₂ (447.88 *m/z*) complex is detected, which supports the results obtained using other techniques. The As(DMPS) (260.87 *m/z*) complex is also detected, and could be a minority species.

These results seem consistent with those obtained by ITC: while DMSA forms ML and then ML₂ complexes, DMPS shows a thermodynamic curve with only one inflection due to the formation of ML₂. Table 2 summarizes the results obtained by ESI-MS, voltammetry, and ITC.

4. Conclusions

For the first time the complexation of As(III) has been successfully studied by a multiple approach combining ITC, ESI-MS and an electroanalytical technique supported by chemometric tools. This methodology yields a reliable and consistent picture of the binding of As(III) by the chelating therapy agents DMSA and DMPS. In the study of the complexation of the As(III) with DMSA two stoichiometries were obtained ML and ML₂, both were observed by all the techniques with a $\log \beta_1 = 4.7$ and $\log \beta_2 = 9.2$. However, when DMPS was considered only the ML₂ complex appears in all the techniques with a $\log \beta_2$ of 9.8. The ML complex was only obtained

by ESI-MS. Besides confirming the usefulness of this combined methodology, the high stability of the predominant ML₂ complexes indicates the effectiveness of DMSA and DMPS in the treatment of As(III) poisoning.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, Project CTQ2009-09471). S.C. thanks MICINN for his Ph.D. Grant (BES2010-032352).

References

- [1] World Health Organization, 1997. Arsenic in drinking water and resulting arsenic toxicity in India and Bangladesh: recommendation for action. SEA/EH/505.
- [2] H.V. Aposhian, M.M. Aposhian, *Chem. Res. Toxicol.* 19 (2006) 1–15.
- [3] P.L. Smedley, D.G. Kinniburgh, *Appl. Geochem.* 17 (2002) 517–568.
- [4] M. Blanus, V.M. Varnai, M. Piasek, K. Kostial, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2771–2794.
- [5] K. Kalia, S.J.S. Flora, *J. Occup. Health* 47 (2005) 1–2.
- [6] J.P.K. Rooney, *Toxicology* 234 (2007) 145–156.
- [7] S.J.S. Flora, S.N. Dube, U. Arora, G.M. Kannan, M.K. Shukla, P.R. Malhotra, *BioMetals* 8 (1995) 111–116.
- [8] E. Chekmeneva, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Chim. Acta* 653 (2009) 77–85.

- [9] A.M. Spuches, H.G. Kruszyna, A.M. Rich, D.E. Wilcox, *Inorg. Chem.* 44 (2005) 2964–2972.
- [10] M. Kopanica, L. Novotný, *Anal. Chim. Acta* 368 (1998) 211–218.
- [11] M. Heyrovský, P. Mader, S. Vavříčka, V. Veselá, M. Fedurco, *J. Electroanal. Chem.* 430 (1997) 103–117.
- [12] R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Anal. Chem.* 82 (2010) 9006–9013.
- [13] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *TrAC, Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 86–92.
- [14] E. Chekmeneva, R. Prohens, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 2860–2866.
- [15] ITC Data Analysis in Origin®. Tutorial Guide, Version 7.0, MicroCal, LLC, Northampton, MA, USA, 2004.
- [16] Matlab Version 7.3.0.267, Mathworks Inc., Natick, MA, 2006.
- [17] M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Crit. Rev. Anal. Chem.* 36 (2006) 295–313.
- [18] S. Cavanillas, J.M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Anal. Chim. Acta* 689 (2011) 198–205.

9.4. Application of different chemometric strategies to voltammetric and UV-vis spectroscopic data to obtain a complexation model: study of the Cu(II) binding with the phytohormone 6-benzylaminopurine.

Santiago Cavanillas, Arístides Alberich, Núria Serrano, José Manuel Díaz-Cruz,
Cristina Ariño, Miquel Esteban.

Analyst 137 (2012) 5420–5427.

Cite this: *Analyst*, 2012, **137**, 5420

www.rsc.org/analyst

PAPER

Application of different chemometric strategies to voltammetric and UV-vis spectroscopic data to obtain a complexation model: study of the Cu(II) binding with the phytohormone 6-benzylaminopurine

Santiago Cavanillas, Arístides Alberich, Núria Serrano,* José Manuel Díaz-Cruz, Cristina Ariño and Miquel Esteban

Received 8th May 2012, Accepted 11th September 2012

DOI: 10.1039/c2an35600g

The complexation processes of Cu(II) by the phytohormone and the possible antitumoral agent 6-benzylaminopurine (BAP) were studied by Differential Pulse Polarography (DPP) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis) in combination with chemometric programs such as Multivariate Curve Resolution by Alternating Least-Squares (MCR-ALS) and Gaussian Peak Adjustment (GPA). All data confirm the formation of the predominant 1 : 1 and 1 : 2 Cu²⁺ : BAP complexes. The corroboration of the presented stoichiometries was performed by ElectroSpray Ionization-Mass Spectrometric (ESI-MS) experiments of the Cu(II)-BAP system at different ratios.

1. Introduction

The application of powerful chemometric methods to the analysis of voltammetric data has evidenced its effectiveness in the study of heavy metal complexation by a variety of ligands of environmental interest such as humic acids, phytochelatins, metallothioneins, *etc.*¹⁻⁴ The fundamentals of the methodology are performing voltammetric titrations of a metal solution with the considered ligand or *vice versa* and subsequently analyzing the experimental data matrices by Multivariate Curve Resolution by Alternating Least-Square (MCR-ALS). As systems studied became intricate due to the extreme overlapping of signals (oxidation processes of the electrode material) and the loss of linearity of electrochemical data (lack of an unvarying value for peak potential), the applicability of MCR-ALS was compromised and its results did not reflect correctly the speciation processes. In order to solve these deficiencies – and somehow to extend the applicability of multivariate analysis – our group has developed methodological adaptations, such as the combined MCR-ALS analysis of spectro- and voltammetric matrices,⁵ and new chemometric tools (*shiftfit*⁶ and *pHfit*⁷) which correct lateral shifts of moving signals, prior to the application of MCR-ALS, to obtain an increment of the linearity of data. Besides, a program based on the fitting of voltammetric signals to parametric functions by Gaussian Peak Adjustment (GPA) has been recently proposed for the multivariate analysis of mobile and overlapping signals which progressively get broader or narrower because of changes in the electrochemical reversibility.⁸

6-Benzylaminopurine (BAP) is a very interesting molecule because of its biological and medicinal applications. On one hand, BAP is a synthetic adenine-type cytokinin commonly used in agriculture due to its properties as a plant growth regulator and cell division stimulator^{9,10} and, on the other hand, it has been established that BAP and particularly its derivatives could be favorably used as antitumoral agents since they are able to induce apoptosis and detain cancerous cells progress.¹¹⁻¹³ In the frame of this last point, remarkable biological research illustrate that the antitumor effect is improved when BAP or its derivatives are complexed with certain transition metal ions (Pt, Co, Cu, Fe and Pd), depending on the extent of this cytotoxic effect both on the metal ion and the type of substituents in adenine.^{11,14} Particularly, it has been found that Cu(II) complexes of 2-chloro-6-benzylaminopurine and 3-chloro-6-benzylaminopurine present a stronger antitumoral activity than the respective non-complexed forms.^{11,15}

Although the synthesis, the tridimensional structure and the magnetic properties of some of these compounds are known,¹¹⁻¹⁵ until now the study in solution of the complexation of BAP or its derivatives with different metal ions has not yet been investigated. Hence, the aim of the present work is to propose a complexation model for the Cu(II)-BAP system by means of the chemometric analysis of voltammetric titrations. In order to get a more complete picture of the complexation process, Differential Pulse Polarography (DPP) and ultraviolet-visible spectroscopy (UV-vis) data are analyzed by MCR-ALS and GPA, the adsorption phenomena onto the Static Mercury Drop Electrode (SMDE) are studied by Elimination Voltammetry with Linear Scan (EVLS) and, finally, the stoichiometries of the complexes obtained are corroborated by Mass Spectrometry (ESI-MS).

Departament de Química Analítica, Facultat de Química, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès 1-11, E-08028 Barcelona, Spain. E-mail: nuria.serrano@ub.edu; Fax: +34 934021233; Tel: +34 934039124

2. Experimental section

2.1. Chemicals and instrumentation

Stock solutions of 1×10^{-3} mol L⁻¹ of 6-benzylaminopurine (Aldrich, $\geq 99.0\%$) were prepared from the solid product solubilized in ethanol (Panreac, p.a.). A standard solution of 1×10^{-5} mol L⁻¹ of this compound in 1% (v/v) of ethanol was prepared daily by dilution of the stock solution. Britton–Robinson buffer, at pH 5.1, adjusted to 0.1 mol L⁻¹ ionic strength by adding NaClO₄·H₂O (Panreac, p.a.) was used as supporting electrolyte. 1×10^{-2} mol L⁻¹ Cu(II) stock solutions were prepared from Cu(NO₃)₂·3H₂O (Merck, p.a.) and standardized complexometrically. Ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 water purification system) was employed in all experiments.

Voltammetric measurements by Differential Pulse Polarography (DPP) and Linear Sweep Voltammetry (LSV) 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 (SMDE), Ag/AgCl, KCl (3 mol L⁻¹), and a glassy carbon rod respectively (Metrohm). The UV-vis spectra were recorded using a UV-vis-NIR spectrometer Lambda 19 of PerkinElmer. Positive-mode ESI-MS spectra were obtained using a Q-TOF Agilent 1100, and pH measurements using an Orion SA 720 pH-meter. All the experiments were carried out at 20 °C and purified nitrogen (Linde N50) was used.

2.2. Procedures

Voltammetric experiments were performed by DPP and LSV in Britton–Robinson buffer, pH 5.1, adjusted to 0.1 mol L⁻¹ ionic strength by adding NaClO₄. In each case, 20 mL of 1×10^{-5} mol L⁻¹ solution were placed in the voltammetric cell. Instrumental parameters for DPP experiments were: 0.9 mm² drop area, 5 mV voltage step, 50 mV pulse amplitude, 0.05 s pulse time, 1 s drop time and 50 mV s⁻¹ sweep rate. After deaerating with pure N₂ for 20 min, DPP curves were recorded. Further, successive additions of 1×10^{-3} mol L⁻¹ titrating solution were made and, after purging with N₂ and stirring mechanically for 1 min, curves were recorded.

LSV measurements were performed in solutions of 1×10^{-5} mol L⁻¹ BAP and 1×10^{-5} mol L⁻¹ BAP with 1×10^{-5} mol L⁻¹ Cu(II) under the same experimental conditions at scan rates of 100, 200 and 400 mV s⁻¹. For the purpose of Elimination Voltammetry with Linear Scan (EVLS), three scan rates with the integer 2 were used ($1/2v_{\text{ref}}$, v_{ref} , $2v_{\text{ref}}$). The scan rate of 200 mV s⁻¹ was chosen as the reference scan rate in all EVLS measurements and the potential was scanned between -0.1 V and -1.6 V.

UV-vis titrations were performed in Britton–Robinson buffer (pH 5.1 and 0.1 mol L⁻¹ ionic strength). In each case, 3 mL of 1×10^{-5} mol L⁻¹ solution were placed in a quartz cell of 10 mm lightpath. Spectra were recorded from 600 to 200 nm at 480 nm min⁻¹ scan rate, 2.00 nm slit and 0.2 s response. Further, successive additions of 1×10^{-3} mol L⁻¹ Cu²⁺ or BAP solution were made.

Electrospray ionization mass spectrometry experiments with direct injection of 50 μ L samples, in 2×10^{-2} mol L⁻¹ ammonium acetate/ammonium hydroxide buffer (pH 5.1), were carried out at 0.1 mL min⁻¹ flow rate with 150 °C source temperature

and 300 °C desolvation temperature. An acetonitrile- 5×10^{-3} mol L⁻¹ ammonium acetate mixture (1 : 9, pH 5.1) was used as a solvent. The applied capillary voltage was fixed at 4 kV, and the effect of cone potential was studied at three different values. The mass spectra were collected throughout a *m/z* range from 100 to 1400. The instrumental control, mass spectra deconvolution and analysis were made with MassHunter Workstation Software (B.02.00).

3. Data treatment

Voltammograms and spectra were adjusted for dilution effects, smoothed, baseline corrected and converted into data matrices by means of homemade programs implemented in Matlab.¹⁶ The application of MCR-ALS method to electroanalytical data has been described elsewhere,^{1,3} including the analysis of matrices constituted by spectro- and voltammetric data.⁵ MCR-ALS decomposes mathematically the instrumental response (matrix *I*) into a product of two matrices *CV*^T, for a preselected number of components, plus an error matrix *X* which contains the remainder of the process: *I* = *CV*^T + *X*. The matricial factorization is performed in an iterative mode guided by constraints which ensure a physicochemical meaning to the mathematical solution, in such a way that matrix *C* contains the concentration profiles and matrix *V*^T the unitary response of every component of the system.

In the case of a simultaneous MCR-ALS analysis of complexometric titrations carried out by DPP and UV-vis techniques, the spectro- and the voltammetric submatrices must share the same distribution of the chemical species along the experiments, a condition fulfilled using the same initial concentration of the metal or ligand and the same values of the metal-to-ligand ratio. Thus, the resulting matrix *C* is unique and common to both techniques, whereas *V*^T is constituted by two parts, one of pure DPP-signals and another of pure UV-vis spectra. Besides, every step of the soft modelling can be performed separately to the sets of data, including the evaluation of the number of components, the initial estimation used to start the iterative process, the application of constraints and the chemical species which are active to each instrumental technique. Regarding the last point, UV-vis-active species are the free and complexed ligand and so the free metal, as Cu(II) presents two possible electronic transitions; DPP-active species are the free metal ion, the electroactive metal complexes and the free ligand, although some reduction signals related to anodic oxidation of mercury (from the electrode) enhanced by the presence of ligands can occur.^{17,18}

The multivariate analysis methods are based on the acceptance of a bilinear response, *i.e.*, every component must contribute independently to the measured magnitude in a proportional way to its concentration. However, the lack of linearity between the signal and concentration is common in electrochemical measurements of complexation processes because of some physico-chemical or kinetic phenomena that take place in the diffusion layer, causing changes in the position and shape of the voltammetric signals. In this respect, Gaussian Peak Adjustment (GPA) proposes a new strategy to extract information from non-bilinear voltammetric data that are based on Parametric Signal Fitting (PSF). Every experimental signal is adjusted by two

Gaussian functions, one at each side of the signal, which contain different parameters (related to the position, height, and widths at half-height) that are optimized by the least squares iterative method. A matrix C of concentration profiles is obtained from the heights or areas of the optimized signals, the last option being more interesting since peak-shape changes modify the relationship between concentration and intensity, while its relationship with the area is constant.

The information yielded from matrices C and V^T (MCR-ALS) and from matrix C (GPA) provides the evolution of the different chemical processes and allows one to propose a complexation model. MCR-ALS and GPA analyses were carried out through several programs implemented in MATLAB (some of them available at http://www.ub.edu/dqaelc/programes_eng.html).

Regarding EVLS measurements, LSV data obtained at different scan rates were smoothed and the values of the elimination coefficients were exported into Microsoft Excel, in which they were further processed by means of EVLS.¹⁹ The selected elimination function E4, where the diffusion current is conserved and the kinetic and charging currents are eliminated, was formed by the following linear combination: $f(I) = -11.657I_{1/2} + 17.485I - 5.8284I_2$,^{20,21} where $I_{1/2}$, I and I_2 are the total voltammetric currents measured at the three different scan rates (integer 2). The theoretical relative error of the elimination function E4 (E4-REEF) with the scan rates ratio based on multiples of two was 21.80.

4. Results and discussion

4.1. Preliminary study of DPP titrations

Fig. 1a shows the experimental DPP curves obtained in the titrations of a 1×10^{-5} mol L⁻¹ BAP solution with Cu(II) until a ratio value of 3.5, and those of the reverse mode are shown in Fig. 1b. At a first inspection, three groups of signals (at *ca.* -0.05, -0.30 and -1.40 V) are clearly observed and, according to our experience in complexation studies, they would be due to the free Cu²⁺, the Cu(II)-BAP complexes and the free BAP, respectively. In addition, (i) some anodic oxidation signals, which are related to the complexes formation, appear strongly overlapped at both sides of the free Cu(II) signal (more evident in Fig. 1a); (ii) signals of complexes undergo a shift towards more negative potential (more evident in Fig. 1b) maybe due to the formation of electrochemically labile complexes or due to a physical phenomenon like electroodic adsorption; and (iii) the behavior of the free BAP signal is unusual in both titrations since its electrochemical reduction seems not to be affected by the complexation processes.

Regarding this last point, when Cu²⁺-ions are added to the free ligand (Fig. 1a), the BAP signal remains constant from the beginning to the end of the titration despite its participation in the formation of the complexes. In contrast, when BAP is added to the Cu²⁺-ions (Fig. 1b), the free BAP signal increases progressively even in the complexes formation stage, as the plot of the BAP signal area *versus* ratio shows (Fig. 1c).

In order to clarify the BAP signal behavior and its effect on the complexes signal evolution, different EVLS experiments were carried out. Linear sweep voltammograms of BAP solution and 1 : 1 Cu(II)-to-BAP solution were recorded, and the application

of the elimination function (E4) yields a peak-counterpeak signal for both free and complexed BAP, which is characteristic in case that the transported species were adsorbed before reduction. Moreover, at a 1 : 1 metal-to-ligand ratio BAP should not remain as a free ligand (Fig. 1d) for which the peak-counterpeak signal in the elimination function results unexpected, as it happened with its signal in some stages of the DPP titrations. The presence of a moderate electroodic adsorption cannot justify the insensitivity of the free BAP signal towards complexation, as a large number of ligands (for example phytochelatin²²) are strongly adsorbed but their signals remain proportional to the free ligand concentration. The key to understand this behavior is in the quite negative potentials in which the reduction process takes place. BAP is reduced at so negative potentials that Cu²⁺ ions reduce at the maximum rate (controlled by diffusion) and this enhances the dissociation of the complex in the diffusion layer and the accumulation of BAP. Then, practically all BAP reduced comes from the free form. This would explain the evolution of the BAP signal in DPP titrations and EVLS experiments but also the continuous potential shift of the complex reduction signals in the BAP to Cu(II) titration (Fig. 1b) since the free BAP concentration increases during all the titration and thus its adsorption onto the mercury drop electrode.

The preliminary MCR-ALS analyses of both voltammetric titrations (data not shown) evidenced three main difficulties in obtaining a reliable complexation model: (i) the absence of information about the free ligand; (ii) in the Cu(II) to BAP titration, the overlapping between the signals of the anodic processes and the signal of the free Cu(II) reduction causes critical problems of selectivity; and (iii) in the BAP to Cu(II) titration, the large potential shift of the complex signals hinders the establishment of an accurate position for the unitary voltammograms of the species.

These difficulties will be solved with a variety of strategies, like using chemometric programs for studying the non-linear behavior or carrying out the same titrations by a spectroscopic technique and then performing MCR-ALS analysis of the data jointly.

4.2. Cu(II) to BAP titration

Taking into consideration the abovementioned problems of the preliminary MCR-ALS analysis, UV-vis spectroscopy was chosen to monitor the same voltammetric titration, since all the species involved in the complexation process are active in UV-vis although those from the voltammetric anodic processes are not involved in UV-vis measurements. Then, a row-wise augmented matrix was built with the voltammetric and UV-vis experimental data (Fig. 2a). A DPP submatrix (left-hand) was cut that only shows the evolution of the free and complexed Cu(II) because of the aforesaid behavior of the BAP signal, whereas the UV-vis submatrix (right-hand) contains the complete evolution of the spectra. The augmented matrix was made by dividing the values of both submatrices by their respective maximum absolute values, since the magnitudes are very different and this fact would be reflected in the weight of each set of data in the iterative ALS optimization. Moreover, the number of columns, *i.e.*, the points of measure for every technique, is very similar.

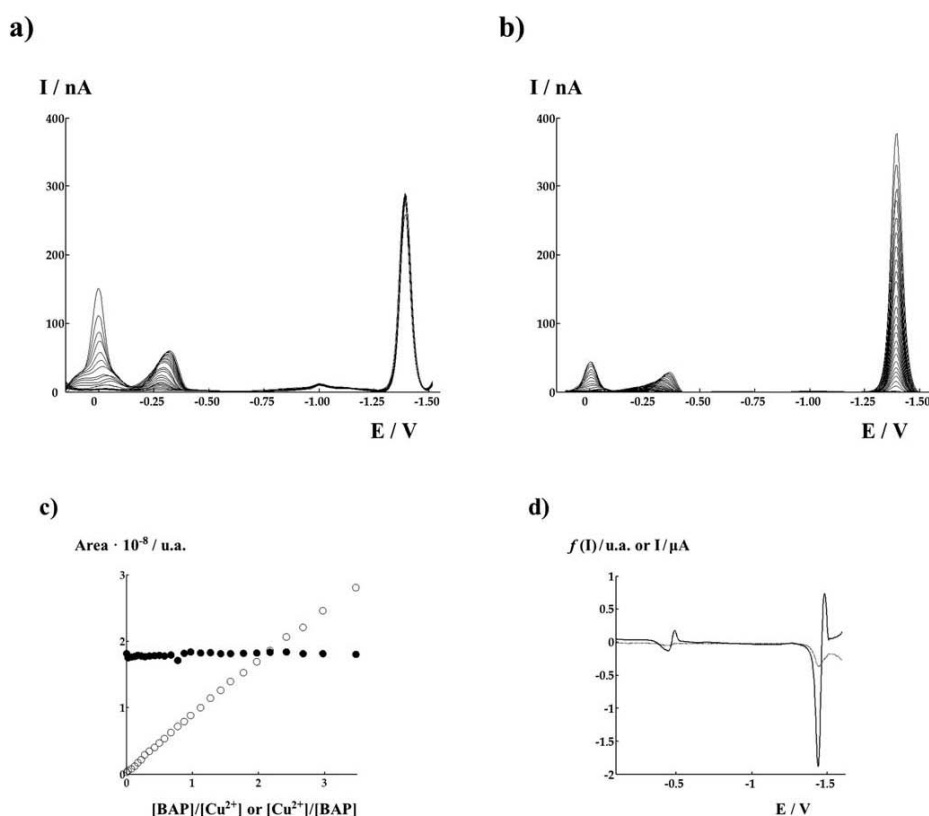


Fig. 1 Experimental data matrix of a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ BAP solution titrated with Cu(II) (a) of a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cu(II) solution titrated with BAP (b); both titrations were performed at pH 5.1 and ionic strength $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$. (c) Representation of the dependence between the BAP signal area and the $\text{Cu}^{2+} : \text{BAP}$ ratio; (●) data from (a) and (○) data from (b). (d) LSV (---) and EVLS (—) curves of a $1 : 1 \text{ Cu}^{2+} : \text{BAP}$ solution at a reference scan rate of 200 mV s^{-1} .

Taking into account the electroactive species and the evolution of the DPP titration, it seems that a complex is formed at the beginning (component 3, at -0.27 V) and then its signal moves slightly towards a more negative potential before Cu^{2+} added remains as free ions (component 2, at -0.01 V) suggesting the formation of a second complex. However, it is difficult to affirm as there is no information about the free ligand and that of the free metal is misleading due to the strong overlap with the anodic signals related to the presence of a complex (component 1, at $+0.07 \text{ V}$). In any case, singular value decomposition (SVD) indicates the presence of at least four components to explain the variability of the DPP submatrix (Fig. 2b, □) for which this movement will be taken into account (component 4 at -0.30 V).

In principle, the same processes should be described by the UV-vis submatrix, but SVD analysis reveals the existence of at the most three components (Fig. 2b, ○). If this set of data and its reverse are considered (data not shown), it can be assured that free BAP (component 5) and free Cu^{2+} (component 2) present significant absorption bands in the UV region, whereas the spectra of the possible complexes appear to be a linear combination of the spectra of the free metal ion and the ligand. This could mean that the absorption processes of Cu(II) and BAP are practically unaffected by complexation, so that both the metal and ligand absorb quite independently, even when they are bound. In such a way, the component related to the complexed

Cu(II) represents in each titration the end of the whole complexation reaction.

After some MCR-ALS tests of the augmented data matrix, the most suitable option from a chemical point of view is considering two complexes for the DPP submatrix and a component in the UV-vis submatrix that would represent the end of the complexes formation, *i.e.*, the component 4 in DPP. Hence, the best results (lof = 7.7%) were achieved assuming (i) five components; (ii) an initial estimation $V_{\text{DPP-UV-vis}}$ built from homemade Matlab program *peakmaker*⁶ for the DPP submatrix, and SIMPLISMA²³ for the UV-vis submatrix; (iii) applying the constraints of non-negativity (for both concentrations and signals), selectivity for free BAP at the beginning of the titration and DPP-signal-shape for all components except for component 4 (in order to include the small signals related also to its anodic oxidation process).

The complexation picture of the Cu(II) to BAP titration is now easier to interpret when matrices V^T and C are analyzed (Fig. 2c and d) because the addition of the spectroscopic data to the MCR-ALS analysis confers information about the free ligand and clarifies the ambiguity that components 1 and 2 presented in terms of voltammetric selectivity. So, when a metal is added to a ligand, a $1 : 2 \text{ Cu}^{2+} : \text{BAP}$ complex is formed since component 3 appears from the beginning of the titration, reaches its maximum at a ratio of 0.5 and then decreases. In this complex, Cu(II) would

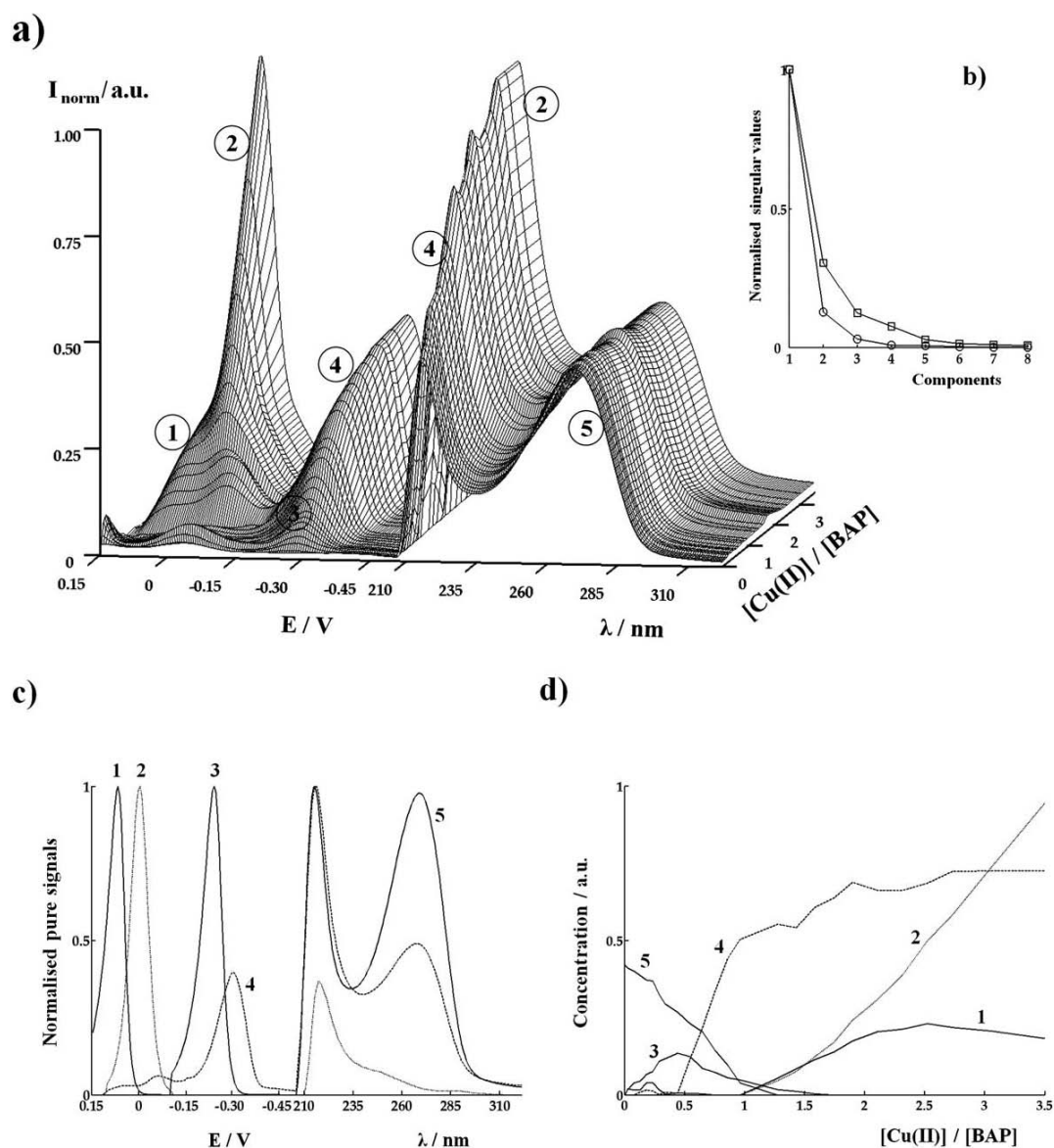


Fig. 2 (a) Combined matrix of DPP voltammograms and UV-vis spectra obtained from the titrations of a $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ BAP solution with Cu(II) at pH 5.1 and ionic strength $0.1 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaClO}_4$. (b) Singular value decomposition of DPP (\square) and UV-vis (\circ) submatrices. Normalized unitary response vectors (c) and concentration profiles (d) obtained from the MCR-ALS decomposition of augmented data matrix. Component assignments: 1 anodic signal; 2 Cu^{2+} -ion; 3 $\text{Cu}(\text{BAP})_2$ complex; 4 $\text{Cu}(\text{BAP})$ complex; and 5 BAP.

be strongly bound to two BAP molecules, as the difference between the peak potentials of pure DPP-signals of the free metal (component 2) and 1 : 2 Cu^{2+} : BAP complex (component 3) suggests (Fig. 2c). As more metal is added, the 1 : 2 Cu^{2+} : BAP complex disappears to form a 1 : 1 Cu^{2+} : BAP complex, as the concentration profile of component 4 indicates, increasing from the ratio value of 0.5 to 1, and then remaining constant. Fig. 3 shows the sequence for the formation of the 1 : 2 Cu^{2+} : BAP and 1 : 1 Cu^{2+} : BAP complexes, in accord with the molecular structure characterized in solid state.¹²

At this point of the titration, the complexation process is complete and thus the concentration profile of the Cu^{2+} : BAP

complex stabilizes and Cu(II) appears as free ions (component 2 in Fig. 2d). Regarding the free BAP signal (component 5), it decreases from the beginning of the titration until a Cu-to-BAP ratio of 1, which can be confusing since actually all the BAP is complexed due to the complete 1 : 2 Cu^{2+} : BAP complex formation at ratio 0.5. This occurs because its concentration profile only proceeds from the UV-vis titration and the changes in its spectrum entail the whole complexation process, from free BAP to the 1 : 1 Cu^{2+} : BAP complex, probably because the first complex implies a lineal combination between them. Lastly, component 1 seems to be an anodic signal related to the formation of a complex whose intensity is typically much

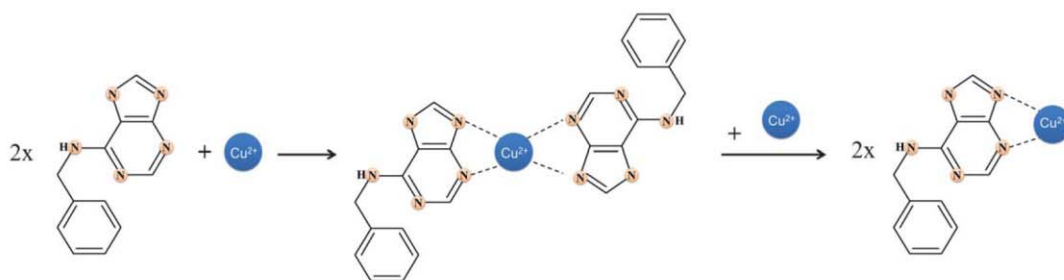


Fig. 3 Tentative structures of the complexation equilibria occurring in the solution during copper–BAP interaction.

increased due to its strong overlapping to an increasing signal, the free Cu(II) in this case. Anyway, this kind of anodic signals rarely provides significant information.

4.3. BAP to Cu(II) titration

Fig. 4a presents the data matrix obtained from DPP curves of the titration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cu(II) solution with BAP. In the first voltammogram, the reduction of free metal is undoubtedly associated with the signal placed at -0.01 V whereas the reduction of Cu(II) bound to BAP appears at -0.30 V . With the

successive additions of BAP, the complex signal undergoes a very large shift of 100 mV and two anodic signals of small height related to the complexes formation appear overlapped at each side of the free metal signal (at 0.06 V and -0.06 V , respectively). Although this lateral movement probably hides more than one species, the real cause of the constant variation of the potential peak during all the experiment seems to be the increment of the electrodic adsorption of BAP on the mercury electrode, as previously demonstrated (see Section 4.1). In any case, this movement generates a lack of linearity in the electrochemical data – confirmed by the distribution of components in SVD (Fig. 4b) – that hinders the collection of good results from a MCR-ALS analysis; moreover, as the different stoichiometries of the BAP–Cu(II) complexes are not discerned in UV-vis measurements, the same kind of chemometric analysis of a spectro- and electrochemical matrix is not able to improve the results. On the other hand, circular dichroism (CD) experiments were performed because of their selective response to the different spatial conformations of complexed molecules, but the weakness of the BAP signal in CD caused that the concentration required were two orders of magnitude higher than those for DPP experiments, preventing the subsequent simultaneous MCR-ALS analysis.

An alternative chemometric method to study the complexation processes of this titration is based on the use of the new algorithm Gaussian Peak Adjustment (GPA), since it is able to correct the large displacement observed in the potential axis and the changes in the width of signals, *i.e.*, to solve data matrices which present a great loss of linearity.^{24,25} The evolution of the DPP signals was analyzed by taking as reference the values of the potential peak of each species in the Cu(II) to BAP titration. Component assignments are maintained, then free metal is component 2 and the first complex would be component 4; in the same way, the anodic signal located at a more negative potential is assigned to component 1 while the other anodic signal needs to be explained with a new component (component 6). This last anodic signal was included in component 4 in the MCR-ALS analysis but GPA has to fit voltammetric signals individually. Regarding the existence of component 3, it should be located at a potential slightly more positive than component 4 but, as has been already said, the electrodic adsorption displaces it from its position in the reverse titration.

Following the changes that experimental curves show, the application of GPA was performed with a restriction matrix that allows the adjustment of the movement and broadening of component 4, so as the subsequent narrowing of the component

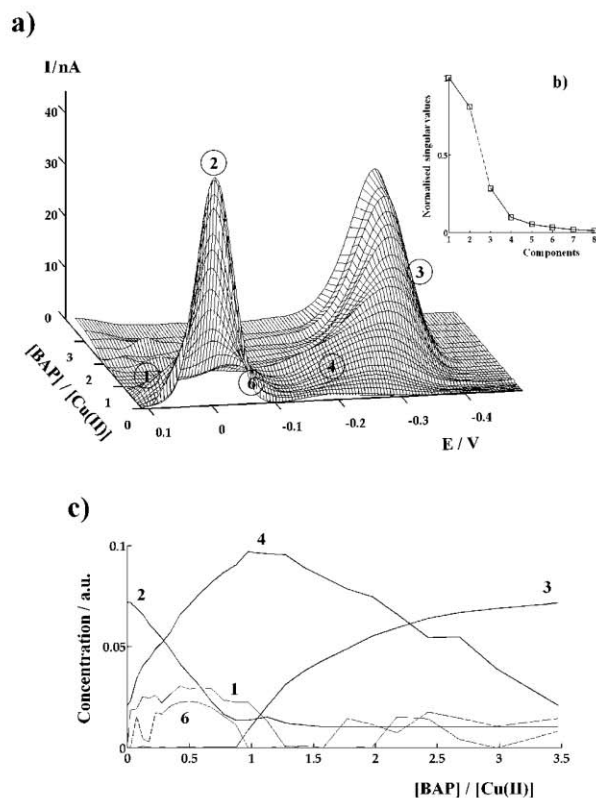


Fig. 4 (a) DPP voltammograms obtained from the titration of $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ Cu(II) solution with BAP at pH 5.1 and ionic strength 0.1 mol L^{-1} NaClO₄. (b) Singular value decomposition of experimental data. (c) Concentration profiles obtained by GPA. Component assignments: 1, 6 – anodic signals; 2 – Cu²⁺-ion; 3 – Cu(BAP)₂ complex and 4 – Cu(BAP) complex.

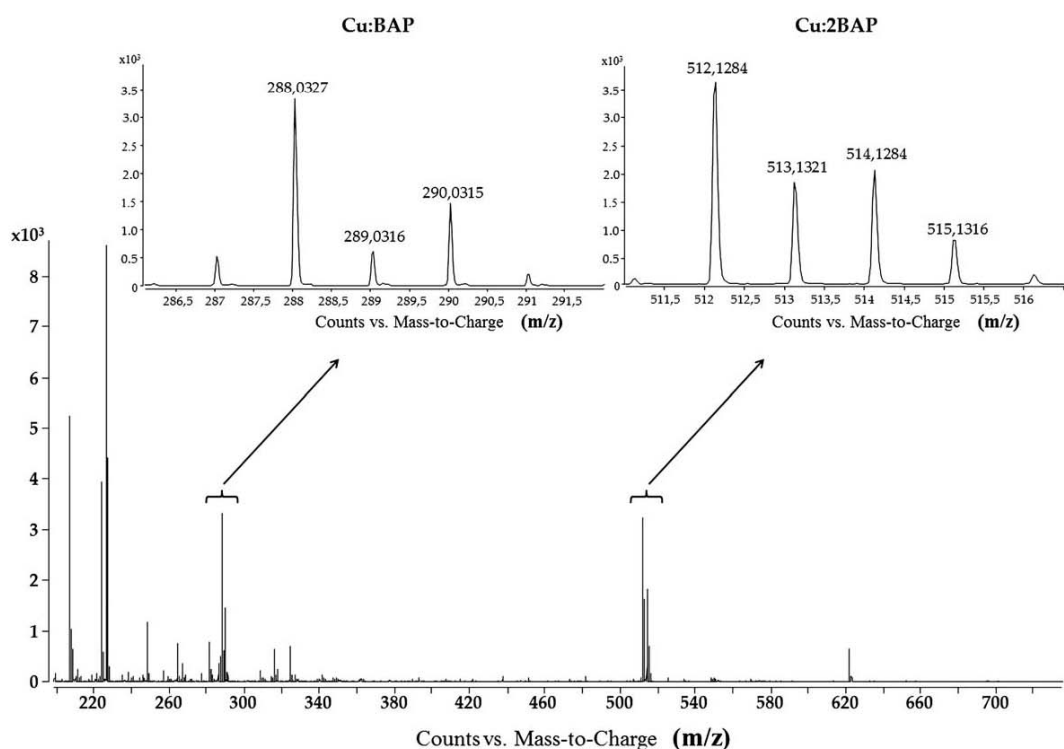


Fig. 5 Positive mode ESI-MS spectrum for a 2 : 3 Cu^{2+} : BAP sample with the direct injection of 50 μL , in $2 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ CH}_3\text{COONH}_4 \text{ NH}_4\text{OH}$ buffer (pH 5.1), at a flow rate of 0.1 mL min^{-1} with an applied cone potential of 300 V.

3. Taking advantage of the peak-shaped adjustment, the program yields a concentration profiles matrix from the fitted peak areas (Fig. 4c) with a good reproduction of the data (lof = 8.6%). As can be seen, the concentration of Cu(II) as free ion decreases until its disappearance at ratio 1 because a 1 : 1 Cu^{2+} : BAP complex forms. This complex signal increases until it reaches a maximum at ratio 1 and then decreases due to the formation of a second 1 : 2 Cu^{2+} : BAP complex which stabilizes at ratio 2 (Fig. 3). Regarding the anodic signals, their adjustment is difficult to carry out because the baseline and this kind of signals are slightly differentiated, although anyway the information provided is also not reliable in this experiment.

4.4. Study by ESI-MS

The Cu(II)–BAP system was studied by ElectroSpray Ionization–Mass Spectrometry (ESI-MS), in order to confirm the stoichiometries proposed by voltammetric and spectroscopic experiments (Fig. 5). The complexation was studied by analyzing samples obtained from different experimental designs. The influence of optimal cone voltage was studied in order to obtain the optimized signal (100 to 300 V). The isotopic distribution was reproducible for all applied potentials, although signals at 300 V of the skimmer cone potential allowed better results.

The set of experiments consists in the study of the Cu(II)–BAP system at certain characteristic ratios. In the absence of metal, the BAP signal is clearly observed ($[\text{BAP}]^+$, at 226.11 m/z). In samples with a ratio lower than 1 : 2 Cu^{2+} : BAP only $[\text{Cu}–\text{BAP}_2]^+$ (ML_2 at 512.13 m/z) is appreciable, whereas at higher

Cu(II) concentrations (from 2 : 3 to 3 : 1 Cu^{2+} : BAP) both complexes $[\text{Cu}–\text{BAP}_2]^+$ and $[\text{Cu}–\text{BAP}]^+$ (ML , at 288.03 m/z) are detectable. In summary, ESI-MS experiments corroborate the voltammetric results where the presence of the ML and ML_2 stoichiometries are concluded.

5. Conclusions

The complexation study of the Cu(II)–BAP system by voltammetric titrations yields two sets of experimental data that contain serious uncertainties. In the case of Cu(II) to BAP titration, both the insensitivity of the BAP reduction signal to the complexation process and the selectivity problems between the anodic- and the free metal reduction-signals led us to choose UV-vis spectroscopy to perform a combined MCR-ALS analysis, since both free ligand and free metal are UV-vis active species. In the case of BAP to Cu(II) titration, the voltammetric data present a dramatic loss of linearity due to the large potential shift of the complex signals. Taking into account the quite independent character of UV absorption bands of the metal ion and the free BAP, which are only slightly modified by complexation, the spectroscopic data cannot improve the MCR-ALS analysis. Thus, the application of a new chemometric strategy to non-bilinear voltammetric data by GPA analysis allowed us to confront these difficulties.

The overall picture of this study shows the formation of two successive complexes of stoichiometries 1 : 1 and 1 : 2 Cu^{2+} : BAP, depending of the metal-to-ligand ratio. This complexation model is confirmed by ESI-MS experiments and tentative structures are presented, although structural techniques

(that cannot work at such diluted concentrations) would be required for an unambiguous structural determination of the chemical species.

Acknowledgements

The authors acknowledge financial support from the Spanish Ministerio de Ciencia e Innovación (MICINN, project CTQ2009-09471). Santiago Cavanillas is grateful to MICINN for his Ph.D. grant (BES-2010-032352).

References

- 1 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, 2006, **36**, 295–313.
- 2 Y. Ni and S. Kokot, *Anal. Chim. Acta*, 2008, **626**, 130–146.
- 3 M. Esteban, C. Ariño and J. M. Díaz-Cruz, Chemometrics in Electrochemistry, in *Comprehensive Chemometrics*, ed. S. D. Brown, R. Tauler and B. Walczak, Chemical and Biochemical Data Analysis, Elsevier Science, Oxford, 2009, vol. 4.
- 4 M. del Valle, *Electroanalysis*, 2010, **22**, 1539–1555.
- 5 A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2007, **584**, 403–409.
- 6 A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2008, **133**, 112–125.
- 7 J. M. Díaz-Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño and M. Esteban, *Analyst*, 2010, **135**, 1653–1662.
- 8 S. Cavanillas, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Anal. Chim. Acta*, 2011, **689**, 198–205.
- 9 C. O. Miller, F. Skoog, M. H. Von Saltza and F. M. Strong, *J. Am. Chem. Soc.*, 1955, **77**, 1392.
- 10 P. Tarkowski, L. Ge, J. W. H. Yong and S. N. Tan, *TrAC, Trends Anal. Chem.*, 2009, **28**, 323–335.
- 11 M. Malon, Z. Travnicek, M. Marysko, J. Marek, K. Dolezal, J. Rolcik and M. Strnad, *Transition Met. Chem.*, 2002, **27**, 580–586.
- 12 A. Klanicova, Z. Travnicek, J. Vanco, I. Popa and Z. Sindelar, *Polyhedron*, 2010, **29**, 2582–2589.
- 13 *Progress in Cell Cycle Research*, ed. L. Meijer, S. Guidet and L. Vogel, 1996, vol. 2, p. 284.
- 14 K. Dolezal, I. Popa, V. Krystof, L. Spichal, M. Fojtikova, J. Holub, R. Lenobel, T. Schmuelling and M. Strnad, *Bioorg. Med. Chem.*, 2006, **14**, 875–884.
- 15 M. Marysko, R. Zboril, M. Maslan, J. Marek, K. Dolezal, J. Rolcik, V. Krystof and M. Strnad, *Inorg. Chim. Acta*, 2001, **323**, 119–129.
- 16 Matlab, *Version R2008b ed.*, Mathworks Inc., Natick, MA, USA, 2008.
- 17 J. M. Sequaris, *Compr. Anal. Chem.*, 1992, **27**, 115–157.
- 18 E. Casassas and M. Esteban, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1985, **194**, 11–25.
- 19 O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.*, 1996, **402**, 19–28.
- 20 L. Trnkova and O. Dracka, *J. Electroanal. Chem.*, 1996, **413**, 123–129.
- 21 N. Serrano, K. Klosova and L. Trnkova, *Electroanalysis*, 2010, **22**, 2071–2080.
- 22 N. Serrano, I. Sestaková, J. M. Díaz-Cruz and C. Ariño, *J. Electroanal. Chem.*, 2006, **591**, 105–117.
- 23 W. Windig and J. Guilment, *Anal. Chem.*, 1991, **63**, 1425–1432.
- 24 C. Gilsanz, R. Gusmao, E. Chekmeneva, N. Serrano, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño and M. Esteban, *Electrochim. Acta*, 2011, **56**, 5988–5992.
- 25 S. Cavanillas, R. Gusmao, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz and M. Esteban, *Electroanalysis*, 2012, **24**, 309–315.

9.5. Discusión de resultados

9.2. Voltammetric Analysis of Phytochelatin Complexation in Ternary Metal Mixtures Supported by Multivariate Analysis and ESI-MS.

La nueva metodología desarrollada (PSF-GPA) ha sido aplicada a los datos polarográficos obtenidos en el estudio del sistema complejante competitivo entre el Cu(II), el Cd(II) y el Pb(II) con la fitoquelatina de cadena más corta PC₂ (2 grupos tiólicos) y la más larga existente en la naturaleza PC₅ (5 grupos tiólicos). Todos los voltamperogramas registrados en cada valoración se analizaron aplicando el programa GPA para interpretar los procesos de complejación y analizar la competitividad entre los metales y las fitoquelatinas.

Tras hacer una inspección visual de los datos, se puede ver que estos no muestran una especial pérdida de linealidad, y por tanto, podrían haber sido tratados mediante el método MCR-ALS, como ya se había hecho anteriormente en diversos estudios de interacción entre metales y fitoquelatinas [39,50,124]. No obstante, se eligió este sistema para validar la metodología desarrollada con un sistema complejante complicado, en donde el amplio conocimiento y experiencia del grupo de investigación en estos sistemas permitieron obtener resultados muy valiosos tras el análisis mediante GPA. Para la resolución de este sistema con tres iones metálicos también ayudó un trabajo previo en donde se estudiaba la dinámica de la complejación entre las fitoquelatinas y dos iones metálicos: el Cd(II) y el Pb(II) [39].

Debido a la importancia de conocer las sinergias y antagonismos durante la fitorremediación de metales pesados, se decidió considerar el estudio multimetal con el Cd(II), Pb(II) y Cu(II). Inicialmente, se analizó de manera individual la complejación del ion Cu²⁺ con la fitoquelatina PC₅ mediante DPP ya que no había sido estudiada con anterioridad, y los datos fueron tratados mediante GPA. El perfil de concentraciones por áreas obtenido mostró una capacidad complejante de *ca.* 2,5 Cu(II):PC₅. Este valor es mayor que el encontrado en otros metales estudiados (Zn(II), Cd(II) y Pb(II)) con la PC₅.

Una vez se hubieron considerado los procesos de complejación de manera individual se procedió al análisis competitivo entre mezclas binarias de estos metales. La capacidad del Cd para desplazar al Pb de sus complejos y enlazarse con las fitoquelatinas ya fue

estudiada en un trabajo anterior [39]. Por ello, se estudió la complejación competitiva de las parejas de iones metálicos Cu(II)-Pb(II) y Cu(II)-Cd(II) con las fitoquelatinas PC₂ y PC₅. A continuación, se comentan brevemente los principales resultados obtenidos:

- 1) Para el estudio de competición entre el Pb(II) y el Cu(II) con las fitoquelatinas, se adicionaron alícuotas de Cu²⁺ a una disolución de Pb(II) y PC₅, en la cual los iones Pb²⁺ están totalmente complejados por la fitoquelatina. Tras el análisis quimiométrico por GPA y la interpretación del perfil de concentraciones obtenido, se observa una disminución de la señal del complejo de Pb y, al mismo tiempo, un aumento de la señal correspondiente al complejo de cobre (Figura S2 del supporting information SI del artículo). Este comportamiento evidencia la mayor afinidad del Cu para enlazarse a las fitoquelatinas, siendo capaz de reemplazar al Pb²⁺ de sus complejos.

- 2) Un estudio similar se llevó a cabo con los iones Cd²⁺ y Cu²⁺ y la PC₂. Inicialmente, se preparó una disolución 3:1 Cu²⁺:PC₂, para asegurar que todo el cobre estuviera complejado, y a continuación se adicionaron alícuotas de Cd²⁺ (Figura S3 del SI del artículo). Una vez analizados los datos por GPA se observa como la señal correspondiente al ion Cd²⁺ libre aparece desde el principio y las señales correspondientes tanto del cobre libre como la de sus complejos se mantienen constantes durante todo el experimento. Este comportamiento denota la incapacidad del Cd²⁺ para formar complejos con las fitoquelatinas en presencia de iones Cu²⁺. Por lo que se deduce, también en este caso, una mayor afinidad del cobre con las fitoquelatinas.

Estos sistemas no presentaban una falta de linealidad, solamente un gran solapamiento entre algunas señales, como las señales correspondientes al Pb²⁺ libre y la oxidación anódica de los complejos de éste con la fitoquelatina PC₅. La interpretación inequívoca de los procesos de complejación competitiva entre el Pb²⁺ y el Cu²⁺ se ve obstaculizada por la gran superposición de dichas señales, las cuales tuvieron que ser restringidas en forma y posición para la resolución por GPA. Este hecho se solventó satisfactoriamente y solamente el inicio del perfil de concentración de una estas señales quedó distorsionado.

Finalmente, tras resolver los procesos de competición a nivel binario entre estos metales, se llevaron a cabo una serie de experimentos donde los tres iones metálicos

Cd^{2+} , Cu^{2+} y Pb^{2+} competían para formar complejos con las fitoquelatinas. De esta manera se comprobó si el comportamiento era el esperado tras la extrapolación de los resultados del estudio anterior. Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

- 1) Se valoró una disolución de fitoquelatina PC_5 mediante sucesivas adiciones de una mezcla equimolar de los tres iones metálicos (Figura 2 del artículo). Los perfiles de concentración (áreas) obtenidos mediante GPA son muy complejos debido al gran número de señales y el solapamiento de éstas. La existencia de 6 componentes en un estrecho intervalo de potencial (entre -0,35 y -0,7 V), provocó que no se pudiera diferenciar entre la señal de la reducción del Pb^{2+} libre y la señal anódica de los complejos.

En el perfil de concentraciones se observa ya tras las primeras adiciones, la disminución de la concentración del ligando, el cual se une simultáneamente a los tres cationes, según indica la aparición de las señales relacionadas con la reducción del Pb^{2+} , Cd^{2+} y Cu^{2+} complejados por la PC_5 . Posteriormente, a un ratio superior a 3, aparecen y crecen las señales de las reducciones del Cd^{2+} y Cu^{2+} libre, sugiriendo la posibilidad de que se formen complejos de estructura ($\text{M}^{\text{I}}\text{M}^{\text{II}}\text{PC}_5$). Finalmente, se detectó una señal (componente 9, Figura 2 del artículo) que podría estar asociada con las reducciones del Cd^{2+} o del Cu^{2+} en un complejo mixto (CdCuPC_5).

- 2) Con el objetivo de confirmar la mayor afinidad del cobre por las fitoquelatinas se hicieron valoraciones en las que se adicionaba Cu^{2+} a disoluciones 2:2:1 Cd:Pb: PC_2 y 3:2:1 Cd:Pb: PC_5 . La aplicación del algoritmo GPA proporcionó unos perfiles de concentración que permitieron analizar ambos sistemas (Figura 3 del artículo). En ambos casos, el primer voltamperograma presentaba cuatro señales: i) una señal anódica relacionada con los complejos CdPC_n ; ii) una señal de reducción del Pb^{2+} libre; iii) una señal de reducción del Cd^{2+} libre; iv) y una señal de reducción de los complejos de CdPC_n . Tras la sucesivas adiciones de Cu^{2+} aparece la señal anódica relacionada con los complejos CuPC_n (0,04 V) hasta la aparición de un exceso de este metal. Para ambas valoraciones, la señal de reducción de Pb^{2+} libre es estable a lo largo de los experimentos y las pequeñas variaciones podrían ser debidas a la superposición con señales procedentes de los procesos anódicos del Hg. Esto indica que el Pb^{2+} no se

reincorpora a los complejos con las PC_n. Por otra parte, la señal de reducción del Cd²⁺ libre aumenta en ambos experimentos, indicando el intercambio del Cu²⁺ por el Cd²⁺ en los complejos Cd-PC_n, previamente formados.

Finalmente, se identificaron mediante ESI-MS los diferentes complejos que se forman entre los tres iones metálicos (Cu(II), Cd(II) y Pb(II)) y las fitoquelatinas PC₂ y PC₅:

- 1) Los complejos que forma el Cu²⁺ con la PC₂ son Cu(PC₂), Cu₂(PC₂), y Cu₃(PC₂). La existencia del último complejo deja intuir que el cobre no sólo se enlaza con el grupo tiol sino que lo hace también a través del grupo carboxílico. En cambio con la PC₅, se detectaron el Cu(PC₅), Cu₂(PC₅), Cu₃(PC₅), Cu₄(PC₅) y Cu₅(PC₅).
- 2) Se realizaron experimentos a diferentes relaciones entre Pb²⁺, Cd²⁺ y Cu²⁺ con la PC₂. A ratios bajos PC₂:M²⁺ sólo se observan los complejos CuPC₂ y CuCdPC₂. Al aumentar la concentración de PC₂ aparecen los complejos de CdPC₂ y ternarios como el CdPbPC₂. A relaciones más altas de PC₂ el Cd²⁺ y Cu²⁺ se complejan ampliamente e incluso se forman los complejos de PbPC₂ (Figura 4 del artículo).
- 3) Tras realizar el mismo análisis con la fitoquelatina PC₅ se observa que a ratio 1:1 (PC₅:M²⁺) sólo aparecen los complejos Cu(PC₅), Cu₂(PC₅), Cd(PC₅) y algunos complejos ternarios CuCdPC₅. Esto demuestra que los complejos de cobre más estables son Cu(PC₅), Cu₂(PC₅) y tal vez Cu₃(PC₅), como se deduce en los experimentos de voltamperometría a partir de la relación en donde aparece el exceso de Cu²⁺. Al aumentar las relaciones primero aparecen los complejos de Cd²⁺, incluyendo el complejo CdPbPC₅, y finalmente, una vez los iones metálicos Cd²⁺ y Cu²⁺ se han complejado, aparecen los complejos de Pb²⁺.

En todos los experimentos polarográficos evaluados por el programa GPA, la interpretación del comportamiento se realizó de manera satisfactoria a partir del análisis del perfil de concentraciones tanto por áreas como por intensidades. La interpretación de los resultados voltamperométricos junto a los experimentos de ESI-MS muestra el orden de afinidad de estos tres metales por las fitoquelatinas: Cu(II) > Cd(II) > Pb(II). Los resultados también indican que el Pb²⁺ se excluye en la formación de complejos con las PCs en presencia de Cd²⁺ o Cu²⁺.

9.3. Electroanalytical and isothermal calorimetric study of As(III) complexation by the metal poisoning remediators, 2,3-dimercapto-1-propanesulfonate and meso-2,3-dimercaptosuccinic acid.

En el siguiente artículo se estudió la complejación del As(III) con dos agentes quelantes utilizados para la desintoxicación de metales pesados, el DMSA (ácido dimercaptosuccínico) y el DMPS (dimercapto-propano sulfonato). Para la resolución de estos sistemas se aplicó la metodología PSF-GPA a todas las señales, excepto a la señal de reducción del arsénico libre que aparece en la zona de la descarga de los protones (*ca.* -1.6 V) y no tiene forma de pico. Por este motivo, se cortó esta señal y se trató aparte mediante MCR-ALS. La falta de experiencia previa sobre la complejación del arsénico y la inexistencia de bibliografía de carácter electroquímico que estudie los procesos implicados en la interacción con estos ligandos, hizo que este sistema fuese una buena oportunidad para evaluar la capacidad resolutive del PSF-GPA. En la literatura se encontró un estudio espectroscópico sobre la complejación de As(III)-DMSA [125] y fue el que sirvió para la validación de los resultados obtenidos con el GPA. Todo ello permitió proponer un método voltamperométrico junto a un posterior análisis quimiométrico mediante el GPA para estudios de complejación de As(III). Éste fue aplicado al sistema As(III)-DMPS ofreciendo información de sus interacciones y de los complejos, sobre los que no existe información en la literatura.

En los voltamperogramas de la valoración de As(III) con el DMSA, se observan seis señales diferentes que corresponden a procesos anódicos relacionados con los complejos de arsénico (componentes 1, 3, 4, y 5), una señal anódica relaciona con el DMSA libre (componente 2) y una señal de reducción del As(III) libre (componente 6) (Figura 1a del artículo). Tras el análisis de los datos voltamperométricos mediante el método GPA, los perfiles de concentración muestran como la señal correspondiente a la reducción del As(III) disminuye hasta un ratio *ca.* 2. Las señales correspondientes a las procesos anódicos entre los complejos de As(III) y el Hg del electrodo muestran dos comportamientos claramente diferenciados, una de ellas aumenta hasta alcanzar un máximo a ratio 1 y la otra, en cambio, se estabiliza a ratio 2 (Figura 1b del artículo). El análisis global del sistema indica la formación inicial del complejo ML y que al aumentar la concentración de DMSA, se forma el complejo ML₂. Estos resultados coinciden con los encontrados en la bibliografía.

A continuación, tras la resolución satisfactoria del sistema anterior, se procedió a proponer un modelo de complejación para el As(III) y el agente quelante DMPS. Los voltamperogramas de la valoración de As (III) con DMPS fueron tratados quimiométricamente de igual manera, aunque se aplicó el conocimiento obtenido en el sistema del DMSA para una mejor interpretación del nuevo sistema. En el análisis de la valoración de As(III) mediante sucesivas adiciones de DMPS se observa la disminución de la señal de reducción del As(III) hasta su desaparición a un ratio *ca.* 2. Las cuatro señales anódicas (componentes 1, 3, 4, y 5) que están relacionadas con los complejos formados aumentan aunque la relación que alcanzan es algo incierta (*ca.* 1,5 - 2), y esto parece indicar que no se forma de manera significativa el complejo ML. El uso del GPA nos permitió resolver la superposición de la señal anódica relacionada con el DMPS libre y la de sus complejos de arsénico (componente 3), lo que nos permitió observar claramente la aparición de la señal de DMPS a ratio 2 (Figura 3b del artículo). Tras la interpretación de todas las señales se concluye que se forma un único complejo (ML₂).

Para aclarar este comportamiento se analizó también la valoración inversa, en donde se adiciona As(III) a una disolución de DMPS. Los perfiles de concentración dados por el GPA (Figura 2b del artículo) muestran como el DMPS disminuye hasta un ratio de 0,5 lo que indica la formación del complejo ML₂. Todo ello, se confirma por la aparición y estabilización de las señales correspondientes a los complejos de As(III) a una relación de 0,5 donde también se observa la aparición de la señal de reducción del As(III) en exceso.

Con el objetivo de corroborar las estequiometrías de los complejos, se inyectaron de manera directa disoluciones con diferentes ratios metal:ligando en un espectrómetro de masas de ionización por electrospray. Para el sistema del DMSA, se han detectado los complejos de arsénico As(DMSA) y As(DMSA)₂, es decir, los mismos que los determinados a través del análisis de los datos voltamperométricos. El mismo procedimiento se aplicó al sistema As(III):DMPS donde se encontraron los complejos As(DMPS) y As(DMPS)₂. El segundo complejo fue el único detectado tras el análisis de los resultados voltamperométricos, pero el complejo As(DMPS) observado por MS podría ser una especie minoritaria que no pudiese ser detectada por DPP.

Los resultados proporcionan una imagen fiable y consistente de la complejación del As(III) con los agentes quelantes DMSA y DMPS gracias a la versatilidad de las

técnicas voltamperométricas y el análisis quimiométrico de éstas mediante la metodología PSF-GPA. Para complementar el estudio se realizaron valoraciones calorimétricas isotérmicas, las cuales permitieron confirmar los resultados y obtener información de carácter termodinámico, ya que estos sistemas tienen un gran interés a nivel biológico como fármacos para la desintoxicación de metales pesados en el organismo. ITC es una técnica de gran utilidad que nos proporciona la estequiometría de los complejos, las constantes de estabilidad y las entalpías y entropías de las interacciones metal-ligando en ambos sistemas. Los resultados obtenidos se resumen a continuación:

- 1) La integración de los datos termodinámicos de la valoración de As(III) con DMSA muestra la típica curva de ITC con un solo punto de inflexión a un ratio de 0,5 lo cual indica la formación de un único complejo (ML_2). En cambio, la curva de la valoración inversa muestra un proceso exotérmico inicial que indica la formación del complejo ML. Posteriormente tras nuevas adiciones de DMSA, se observa una inflexión exotérmica en la curva de valoración a ratio 2, lo cual confirma la formación del complejo ML_2 como el más estable, con unas constantes de complejación de $\log \beta_1 = 4,7$ y $\log \beta_2 = 9,2$. Los resultados obtenidos con esta técnica concuerdan a la perfección con los resultados obtenidos tras el análisis quimiométrico de los datos voltamperométricos en este sistema.
- 2) Se procedió de igual manera en el estudio calorimétrico del As (III) y el DMPS. Tras la valoración del As (III), los datos termodinámicos obtenidos muestran una curva de valoración con un punto de inflexión a un ratio de 0,5 As(III):DMPS (Figura 4a del artículo), lo que indica la formación del complejo ML_2 , igual que en el estudio con el DMSA. La curva de valoración del DMPS con arsénico muestra un solo punto de inflexión a ratio 2 (Figura 4b del artículo), confirmando los datos voltamperométricos que postulaban la formación única del complejo $As(DMPS)_2$, cuya constante de complejación es $\log \beta_2 = 9,2$. Se concluye, pues, que el complejo $As(DMPS)$ detectado mediante ESI-MS es una especie muy minoritaria en disolución.

Los resultados de ITC muestran en ambos sistemas unas constantes de estabilidad de los complejos del mismo orden. Al observar los valores negativos de entalpía y entropía

para las interacciones se puede concluir que la formación de complejos está impulsada por el valor favorable de ΔH que se opone a la pérdida de entropía. Además, se confirma la alta estabilidad de los complejos predominantes ML_2 indicando la eficacia del DMSA y del DMPS para el tratamiento por envenenamiento con As(III).

9.4. Application of different chemometric strategies to voltammetric and UV-vis spectroscopic data to obtain a complexation model: study of the Cu(II) binding with the phytohormone 6-benzylaminopurine.

El análisis de los datos voltamperométricos obtenidos en el estudio de la complejación entre el cobre(II) y la 6-bencilaminopurina (BAP) ha sido una gran oportunidad para observar y discutir la capacidad y el potencial de la resolución de estos datos mediante el MCR-ALS y el GPA. El estudio de las interacciones entre el Cu^{2+} y el BAP muestra un sistema bastante complicado por lo que respecta a la interpretación de las señales y la falta de conocimiento de los procesos involucrados debido a la poca bibliografía electroquímica existente. Cuando se visualizan los datos obtenidos en la valoración del BAP con Cu^{2+} y viceversa, se observan tres grupos de señales en ambos conjuntos de datos (Figura 1a y b del artículo). A través del seguimiento visual de la valoración se relacionan estos grupos con las señales del Cu^{2+} libre (-0,05 V), los complejos de Cu-BAP (-0,30 V) y el BAP libre (-1,40 V).

La complejidad de los datos en cada zona de señales es evidente: i) junto a la señal de Cu^{2+} libre aparecen algunas señales anódicas solapadas que están relacionadas con la formación de complejos; ii) las señales de los complejos se desplazan a potenciales más negativos (lo que es más evidente en la valoración del cobre). Este comportamiento puede ser debido a la formación de complejos electroquímicamente lábiles o debido a fenómenos físicos como la adsorción electródica; iii) el comportamiento de la señal de ligando libre es completamente inusual, ya que en ambas valoraciones su reducción electroquímica no parece estar afectada por los procesos de complejación.

Para entender este último comportamiento hay que tener en cuenta que, a diferencia de los otros ligandos considerados hasta ahora, el BAP se reduce directamente sobre el electrodo y esta reducción se produce a potenciales muy negativos, mucho más negativos que el potencial necesario para reducir el Cu(II). De esta forma, los iones de

Cu^{2+} se reducen a la velocidad máxima (controlada por difusión). Esto aumenta la disociación del complejo en la capa de difusión y, por lo tanto, la concentración de BAP libre, lo que explicaría la evolución de la señal de este último en ambas valoraciones. En cambio, para explicar el continuo desplazamiento de la señal de los complejos se realizaron experimentos voltamperométricos de eliminación (EVLS) con el fin de determinar las interacciones entre los complejos y la superficie del electrodo. Se realizaron barridos lineales por LSV a diferentes ratios Cu^{2+} :BAP y tras la aplicación de la función de eliminación (E4) se observa una señal pico-contrapico (Figura 1d del artículo). Este resultado implica que las especies transportadas son adsorbidas antes de su reducción, lo que podría explicar el continuo desplazamiento de las señales de los complejos. Aun pudiendo explicar el origen del movimiento a través del eje de potencial, éste dificulta el establecimiento de una posición precisa de los voltamperogramas unitarios de las especies al aplicar el método bilineal MCR-ALS. Por esta razón, se propuso el análisis combinado de la matriz de datos voltamperométricos junto a otra obtenida mediante una técnica diferente, en este caso UV-vis, y de esta manera facilitar la resolución y obtener unos buenos resultados a pesar de la no linealidad.

En el caso del análisis por MCR-ALS de las matrices combinadas con datos provenientes de DPP y UV-vis, las submatrices han de compartir la misma distribución de las especies químicas a lo largo de los experimentos. Esta condición se cumple al realizar las medidas con la misma concentración inicial y los mismos ratios metal-ligando. Por otra parte, la matriz aumentada (figura 2a del artículo) se construye dividiendo los valores de ambas submatrices por sus respectivos valores máximos absolutos con objeto de igualar el peso de magnitudes tan diferentes como la intensidad y la absorbancia en la optimización iterativa ALS. Por último, el número de columnas, es decir, los puntos de medida (potenciales y longitudes de onda, respectivamente) tienen que ser similares para ambas técnicas. La matriz aumentada \mathbf{I}_a se descompone en una matriz \mathbf{C} de concentraciones únicas y comunes en ambas técnicas, y una matriz \mathbf{V}^T constituida por dos partes, señales voltamperométricas y espectroscópicas puras.

En la submatriz DPP no se incluyó la zona que contiene la señal del BAP debido al comportamiento antes mencionado (falta de variabilidad con la concentración de BAP libre en disolución). La descomposición en valores singulares (SVD) indica la presencia de al menos cuatro componentes para explicar la variabilidad de esta submatriz. Por

tanto, determinamos que las especies electroactivas son los iones metálicos de Cu^{2+} libre (componente 2, -0,01 V), una señal anódica relacionada con la formación de los complejos con el BAP (componente 1, +0,07 V) y dos señales correspondientes a la reducciones del Cu complejado (componente 3, -0,27 V; componente 4, -0,30 V). En el análisis mediante SVD de la submatriz UV-vis se observa la existencia de tres componentes (figura 2b del artículo). Al estudiar los espectros tanto individuales como de varias pruebas preliminares se puede asegurar la presencia de la señal del BAP libre y del Cu^{2+} libre, los cuales presentan bandas de absorción significativas en la región UV, mientras que los espectros de los complejos parecen ser una combinación lineal de los espectros del ión metálico y el ligando libre. Esto podría significar que tanto el metal como el ligando absorben de manera independiente, incluso cuando están unidos.

El MCR-ALS resolvió el sistema con un *lof* del 7,7%. Los perfiles de concentración muestran que al realizar las adiciones de Cu^{2+} aparece la señal del primer complejo que alcanza su máximo en una proporción de 0,5 y luego disminuye hasta desaparecer a ratio 1 (Figura 2d del artículo). En esta última región es donde crece y se estabiliza la señal relacionada con el segundo complejo. Esto sugiere que primero se forma el complejo $\text{Cu}(\text{BAP})_2$ y, al aumentar la concentración de cobre se forma el complejo $\text{Cu}(\text{BAP})$, confirmado por la aparición a ratio 1 de la señal de Cu^{2+} libre.

A pesar de la resolución satisfactoria de la valoración inversa mediante el análisis combinado por MCR-ALS, la inspección visual de los datos de la valoración directa de Cu^{2+} con BAP muestra como la serie de señales que corresponden al cobre complejado tienen un desplazamiento mucho más acusado, *ca.* 100 mV (Figura 4a del artículo). Además, la señal del complejo del componente 3 debería estar situada a un potencial ligeramente más positivo que el componente 4, pero la adsorción electroquímica desplaza su posición en la valoración inversa. Este movimiento lateral comprende más de una especie, tal y como hemos visto anteriormente. Aun así, la verdadera causa de la variación constante del potencial durante todo el experimento parece ser el incremento de la adsorción electroquímica del BAP en el electrodo de mercurio, como se ha demostrado tras el análisis por EVLS. En cualquier caso, este gran movimiento genera una considerable pérdida de linealidad en los datos electroquímicos limitando el tratamiento quimiométrico anterior.

Debido a la dificultad de la aplicación de metodologías bilineales se propuso el GPA para tratar quimiométricamente estos datos voltamperométricos no lineales. Para un análisis satisfactorio se aplicaron una serie de restricciones en la matriz **sshift**, la cual permite que se ajuste el movimiento y el ensanchamiento del componente 4 (correspondiente al complejo $\text{Cu}(\text{BAP})_2$), así como, el estrechamiento posterior del componente 3 (correspondiente al complejo $\text{Cu}(\text{BAP})$).

Tras el análisis satisfactorio de los datos voltamperométricos mediante el GPA con un *lof* del 8,6%, se interpretaron los procesos de complejación a través del perfil de concentraciones obtenidos (Figura 4c del artículo) mediante las áreas, más fiables que las intensidades cuando los picos cambian de forma. Se puede observar como la concentración del ion Cu^{2+} libre disminuye hasta su desaparición a un ratio de 1 debido a la formación inicial del complejo ML. La señal correspondiente a este complejo $\text{Cu}(\text{BAP})$ crece y alcanza su máximo a relación 1, para a continuación, disminuir debido a la aparición del complejo $\text{Cu}(\text{BAP})_2$, cuya señal aparece a ratio 1 y aumenta hasta estabilizarse a ratio 2. La resolución exitosa de estos datos voltamperométricos no lineales y su consistencia con los resultados de la valoración inversa por MCR-ALS muestran la gran capacidad del GPA para el análisis de este tipo de datos lo que permite proponer un modelo de complejación para este sistema.

Finalmente, se confirman las estequiometrías mediante experimentos ESI-MS, donde se realizaron inyecciones directas de disoluciones de diferentes relaciones de Cu^{2+} y BAP. Se detectaron las señales del ligando libre BAP y de los complejos ($\text{Cu}(\text{BAP})$ y $\text{Cu}(\text{BAP})_2$), corroborando la presencia de las estequiometrías ML y ML_2 , las cuales fueron previamente determinadas en ambos análisis quimiométricos.

Capítulo 10

Desarrollo de un sensor voltamperométrico con sistema de autopulido

En este capítulo se describe el trabajo realizado durante mi estancia predoctoral en el grupo Biosensor & Bioelectronics de la Universidad de Linköping, Suecia. El trabajo consistió en la optimización y aplicación de un sensor voltamperométrico que incorpora un dispositivo de autopulido. Las ventajas de este sensor provienen tanto de la continua regeneración de la superficie como de su diseño circular, pues así, se evitan la acumulación de los productos de reacción y la adsorción de otras especies, y da lugar a medidas estables y reproducibles. Este nuevo sensor se desarrolló con el objetivo de mejorar la estabilidad de las medidas a largo plazo en una posible aplicación de lenguas electrónicas voltamperométricas (VET) en sistemas donde se produce un deterioro de la superficie electroactiva. El sensor se aplicó para la determinación de urea, la clasificación de muestras de leche en función de su contenido en grasas y la detección de la presencia de aguas residuales en aguas de consumo. Para la interpretación de los resultados se utilizaron los métodos quimiométricos PCA y PLS.

10.1. Introducción

El uso e interés de las lenguas electrónicas (ETs) han crecido durante las últimas dos décadas y hoy en día son ampliamente utilizadas para multitud de aplicaciones [6,103,126-128]. Las ETs básicamente consisten en una unidad de recolección de información en fase líquida, y la posterior aplicación de un procesamiento multivariante de datos. Cuando éstas se someten a una muestra que contiene diferentes compuestos, generan un patrón de salida que representa una síntesis de todos los componentes en la muestra. El patrón de salida viene dado por las diferentes selectividades de las unidades de detección y se correlaciona con las propiedades de las muestras. Existe una gran variedad de lenguas electrónicas basadas en las diferentes técnicas de medida, pero la mayoría de ellas son potenciométricas o voltamperométricas. El uso de lenguas electrónicas voltamperométricas presenta varias ventajas como son la sensibilidad, versatilidad, simplicidad y robustez. Además, en comparación, las medidas voltamperométricas están menos influenciadas por las perturbaciones eléctricas y, por lo tanto, tendrán una favorable relación señal/ruido.

En las lenguas electrónicas voltamperométricas (VET) se aplica un potencial a uno o varios electrodos de trabajo, y para cada electrodo se obtiene una corriente resultante que es la suma de las contribuciones de todas las especies electroactivas que se reducen o se oxidan en la superficie del electrodo. Normalmente para este tipo de medidas se utiliza la voltamperometría de impulsos, especialmente la voltamperometría de impulsos de gran amplitud (LAPV), la voltamperometría de impulsos de pequeña amplitud (SAPV), y también la voltamperometría de escalera. Al aplicar el impulso, la corriente fluirá en la superficie del electrodo creándose la doble capa de Helmholtz y, acto seguido la corriente disminuirá hasta estar limitada por los procesos farádicos de difusión. Normalmente, se aplican una serie de sucesivos impulsos que cambian de amplitud gradualmente.

Debido a la naturaleza de las señales voltamperométricas, la gran cantidad de datos y su aplicación en medios complejos se hace necesaria la aplicación de métodos multivariantes, como el análisis de componentes principales (PCA) para la diferenciación y clasificación de muestras, y mínimos cuadrados parciales (PLS) y redes neuronales artificiales (ANN) para la calibración y cuantificación de diferentes compuestos.

Un problema común de las lenguas electrónicas voltamperométricas es el deterioro de la superficie del electrodo causado por la reducción u oxidación de los analitos o por la adsorción de diferentes especies en la superficie. Todo ello provoca un aumento del límite de detección del método, una baja reproducibilidad de las medidas y una deriva de los datos, lo cual dificulta o imposibilita el análisis de estos. Estos comportamientos suelen producirse cuando las VETs se aplican en medios de elevada complejidad.

La necesidad de desarrollar y aplicar sensores estables que puedan obtener medidas reproducibles evitando además el deterioro de la superficie y que puedan funcionar de manera ininterrumpida durante días, meses o años es evidente [129]. Por otro lado, para comprobar la funcionalidad de estos dispositivos se deben aplicar a sistemas que por su naturaleza y complejidad pueden producir un deterioro importante de la superficie electroactiva.

Con el objetivo de obtener medidas sin desviaciones, repetitivas, reproducibles y con una gran carga de información sobre los sistemas estudiados, se desarrolló un nuevo sensor voltamperométrico con un sistema de autopulido incorporado, el cual fue evaluado con tres sistemas diferentes:

- i) *Análisis de diferentes concentraciones de urea.* Este analito tiene una fuerte tendencia a adsorberse. Además, durante su oxidación, forma una capa sobre la superficie del electrodo debido a su polimerización. Todo esto provoca una pérdida en el área electroactiva del electrodo.
- ii) *Clasificación de muestras de leche según su contenido en grasa.* Esta matriz es una de las más complicadas de analizar mediante sensores electroquímicos, debido a que tiene una gran cantidad de compuestos y algunos de ellos se adsorben fuertemente sobre los electrodos. Además, los gases que contiene la leche dificultan las medidas.
- iii) *Detección y análisis de la presencia de aguas residuales en aguas de consumo.* Este sistema es de crucial importancia por razones sanitarias, además de ser una muestra compleja debido a la variedad y diversidad de los compuestos que puede contener.

10.2. A Self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex and crude media.

Santiago Cavanillas, Fredrik Winqvist, Mats Eriksson.

Manuscript submitted.

A self-polishing platinum ring voltammetric sensor and its application to complex media.

Santiago Cavanillas¹, Fredrik Winquist*² and Mats Eriksson²

Departament de Química Analítica, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, 1-11, E-8028, Barcelona, Spain.¹

Department of physics, Chemistry and Biology, Linköping University, SE-58183, Linköping, Sweden.²

Abstract

A self-polishing voltammetric sensor was recently developed and has been applied to samples of urea, milk and sewage water. The polishing device continuously grinds a platinum ring electrode, offering a reproducible and clean electrode surface. Principal component analysis (PCA) and partial least squares (PLS) techniques were applied to interpret the data and to build prediction models. In an evaluation of samples with different urea concentrations, the grinding step allows for repeatable measurements, similar to those after electrochemical cleaning. Furthermore, for the determination of sewage water concentrations in drinking water and for the evaluation of different fat contents in milk samples, the polishing eliminates sensor drift produced by electrode fouling. The results show that the application of a self-polishing unit offers a promising tool for electrochemical studies of difficult analytes and complex media.

Keywords: Voltammetric sensor, Electronic tongue, Urea, Milk, Drinking water, Sewage water.

1. Introduction

The use and interest of electronic tongues (ETs) have grown during the last two decades and nowadays ETs are widely used in many applications [1]. Various analytical techniques have been developed for use in ETs, such as potentiometry, amperometry and voltammetry, and the obtained data are analysed by multivariate data processing [1-3].

Voltammetric electronic tongues (VETs) offer robust measurements and a versatility of information concerning the studied systems [4-6]. In voltammetry different types of potential

pulses are applied to the working electrodes and the resulting current response is a measure of ionic species and redox active compounds. When used in complex media the current responses are often very complicated with superposed current peaks. Thus, for their interpretation, multivariate data analysis is valuable. Furthermore, this approach makes the use of a conventional reference electrode unnecessary [4], since the counter electrode works as a pseudo reference electrode. The electrode surface of a VET is of key importance since the material surface, its catalytical properties, its adsorption or chemical sorption properties, homogeneity, and smoothness have a high influence on its behaviour.

A general problem of electronic tongues and noses is electrode fouling which causes a decreased detection limit, a low reproducibility and drift. Fouling typically occurs when the ET is applied to crude and complex media. Especially for the VET, oxidised or reduced layers on the electrode surface and adsorption of various species to the surface will cause fouling of the electrodes [7-10].

There are different strategies to avoid or overcome drift problems [11-12]: i) using mathematical tools for drift correction, such as normalization or component correction; ii) recovering the surface with a mechanical polishing step; iii) applying electrochemical cleaning steps; iv) using a mechanical self-polishing device which renews the electrode surface. For the last strategy different self-polishing devices have been developed and applied to VETs with disc electrodes, to avoid fouling of the electrode [13]. After polishing the electronic tongue needs some time for equilibration of the electrodes and during this time drift appears in the measurements.

This report describes the use of a self-polishing VET with a platinum ring working electrode, which is continuously grinded by a sharp glass to eradicate these problems. The counter electrode is also continuously polished. This VET does not require a manual polishing step, neither electrochemical pretreatment, since the automatic physical polishing enables a reproducible and clean electrode surface. In this report this VET was applied and evaluated for studies of urea, milk and sewage water. These samples were chosen due to their known complexity and fouling of electrode surfaces.

2. Experimental section

2.1 The voltammetric sensor

The self-polishing voltammetric electronic tongue consists of a platinum ring working electrode and is housed inside a stainless steel cylinder, also used as a counter electrode, thus omitting the

use of a reference electrode. Platinum was selected as electrode material due to its catalytic properties.

The polishing mechanism consists of two sharp glass pieces that are pressing onto the working electrode surface and the edge of the stainless steel cylinder and turned by an electric engine (9 V) with a speed of one turn every 10 s. The sensor is connected to an electronic unit, built at the laboratory of Applied Physics, containing a potentiostat and a data acquisition board. This is controlled by a computer (Figure 1a).

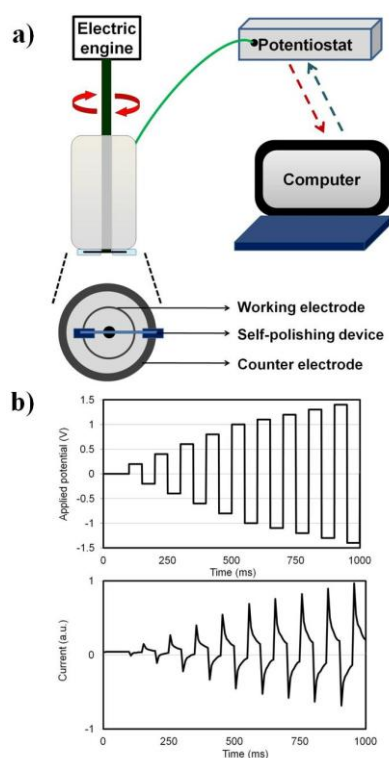


Figure 1. a) Scheme of the self-polishing voltammetric sensor. b) The applied potential scheme (LAPV) with alternating cathodic and anodic potentials from ± 0.2 to ± 1.4 V and a typical current response scan from the voltammetric sensor.

2.2 Selection of samples

The choice of samples is important. Urea is a difficult analyte since it has a strong adsorption effect, and during its oxidation a layer is produced on the electrode surface causing a loss in electroactive area. The determination of urea is important e.g. during monitoring of dialysis, demanding a stable sensor signal.

The second selected sample was milk. It is one of the most difficult media for electrochemical measurements since it consists of many different compounds, some of which adsorb strongly to the electrodes, causing fouling of the electrode surfaces, and consequently a dramatic drift in the data. Also, dissolved gases in the milk make it difficult to analyse. Even so, analysis of milk is important for the dairy industry, e.g. for monitoring quality changes of milk, evaluation of fat contents, detection of clinical mastitis, etc.

Finally, the quality of drinking water is very important for health reasons. If it is accidentally contaminated with sewage water the drinking water can cause severe health problems, as has happened in the past [14]. For this reason, various monitoring systems have been proposed to ensure a good quality of drinking water all the way through piped distribution systems [15]. For this purpose stable sensors that can measure continuously during months and even years are indispensable.

2.3 Chemicals and samples

Working solutions of 5×10^{-1} mol L⁻¹ of urea (Merck) were prepared daily. In the urea study 1×10^{-2} mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS) was used at pH 7.3, prepared from K₂HPO₄ and KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich) and diluted in ultrapure filtered water (Milli-Q plus 185 water purification system).

The set of milk and the cream milk samples with different fat contents were bought at a local market. All milk samples are from the same Swedish milk manufacturer (Arla, Sweden) and were stored at 4 °C.

A stock solution (x50) of synthetic sewage water was prepared diluting the following compounds in sterilized and filtered water: peptone casein pancreatic digest, meat extract, urea, NaCl, CaCl₂, MgSO₄, K₂HPO₄, and NaHCO₃ (Merck) [16], and was stored at 4 °C. The standard solutions were prepared daily by dilution of the stock solution. Real filtered sewage water sample were obtained from a local water treatment plant (Tekniska Verken, Linköping, Sweden) and was stored at 4 °C.

Temperature and pH measurements were made with a Metrel MA 5736 pH meter. All experiments were carried out at room temperature.

2.4 Measurements procedure

Large amplitude pulse voltammetry (LAPV) was performed in the range ± 0.2 to ± 1.4 V using the electronic unit previously described. The applied voltage scan starts at 0 V during 100 ms, then an anodic potential of 0.2 V was applied, thereafter the potential was switched to cathodic -0.2 V. This cycle was repeated with increasing anodic and cathodic potentials of ± 0.2 V, until ± 1.0 V was reached, thereafter the step potential was ± 0.1 V until ± 1.4 V was reached. The applied potentials are shown in Figure 1b. The step time of each pulse was 50 ms. A typical current has an initial charging peak (mixture of non-Faradaic and Faradaic currents) which then equilibrates to the red-ox area (the Faradaic area). When electrochemical cleaning was used, the potentials +2.0 and -2.0 V were applied consecutively during 150 ms before each scan. The number of recorded currents was 140 (20 steps in each scan x 7 recorded current values for each step). A complete scan takes 1 s. The same method was applied for all the samples.

In the urea and sewage water studies, 50 mL of phosphate buffer or equilibrated tap water were used and samples were added and stirred to ensure homogeneity. The cold milk samples were prepared using 250 mL which was heated and stirred until room temperature was reached. Measurements were performed using a slight stirring.

2.5 Data treatment

Multivariate data analysis was performed to treat the voltammetric data. The program SIRIUS (Pattern recognition system, Norway) was used for the evaluation of the data using principal component analysis (PCA), and to build prediction models using partial least-squares (PLS). PCA is a mathematical tool that projects the data to a new coordinate system whose directions are the maximum explained data variance, the axes are called principal components (PCs), and they are orthogonal and linear combinations of the original variables. PLS modelling is a multivariate linear regression based on least squares adjustment to minimize the differences between the observed and predicted values. PLS finds the maximum covariance between the matrix X (matrix of predictor variables) and matrix Y (matrix of predicted variables).

3. Results and discussion

3.1 Urea determination

In order to compare and evaluate the efficiency of the self-polishing function, three operating modes were compared: i) applying the self-polishing unit; ii). applying an electrochemical

cleaning step; iii) no polishing nor electrochemical cleaning. Urea is a difficult analyte since its oxidation has a small steady-state oxidation current at high potentials and strong adsorption effects. In the raw data two different oxidation behaviours were clearly observed (figure 2), one at lower and the other at higher concentrations. This behaviour has been described in the literature [17]. As can be seen from figure 2 for high concentrations of urea, the charging current for negative voltage is larger compared with other concentrations, whereas this is reversed for the redox current.

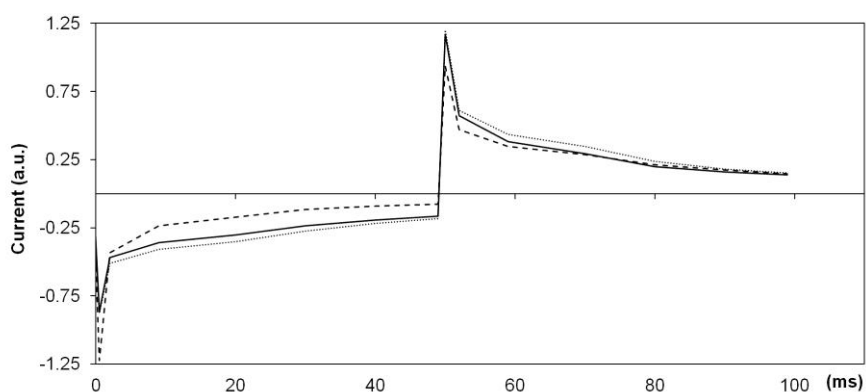


Figure 2. Part of the scan (-1.4 and 1.4 V pulses) of the urea measurement in the self-polishing mode. (—) 1×10^{-2} mol L⁻¹ phosphate buffer solution (PBS), (···) 75 μmol L⁻¹ of urea and (--) 500 μmol L⁻¹ of urea.

The data for low concentrations (5 – 100 μmol L⁻¹) of urea using the self-polishing sensor were analysed by PCA. Figure 3a shows that the different concentrations show a good separation for concentrations above 10 μmol L⁻¹, that they form clusters and that no drift is observed. A corresponding PCA (figure 3b) for a larger concentration interval (5 – 500 μmol L⁻¹) displays two behaviours clearly. A change in the direction with increasing concentration appears at 100 μmol L⁻¹. PC1 separates the higher from the lower concentrations and is explained by the capacitive part of both the positive and negative pulses. These variables also contribute to PC2 which is also explained by the faradic part of both the positive and negative pulses. This dramatic change may be attributed to the polymerization of urea during its oxidation at the electroactive surface, together with a high adsorption on the platinum electrode. Even so, the data is separated in clusters.

The same study was performed using an electrochemical cleaning step before each scan instead of grinding. A PCA plot (figure 3c) for low concentrations of urea also shows reproducible measurements and, also an evident change in the urea reaction is observed (figure 3d) at 150 μmol L⁻¹. Finally, the experiments were also done without any treatment of the electrode surface

(figure 3e,f). A clear drift is seen that increases with increasing concentration up to $200 \mu\text{mol L}^{-1}$ where it seems that the electrode is saturated. These results show that for determination of urea, the treatment of the surface is essential. Self-polishing is comparable to electrochemical cleaning at low concentrations, while electrochemical cleaning is the most efficient method at high concentrations.

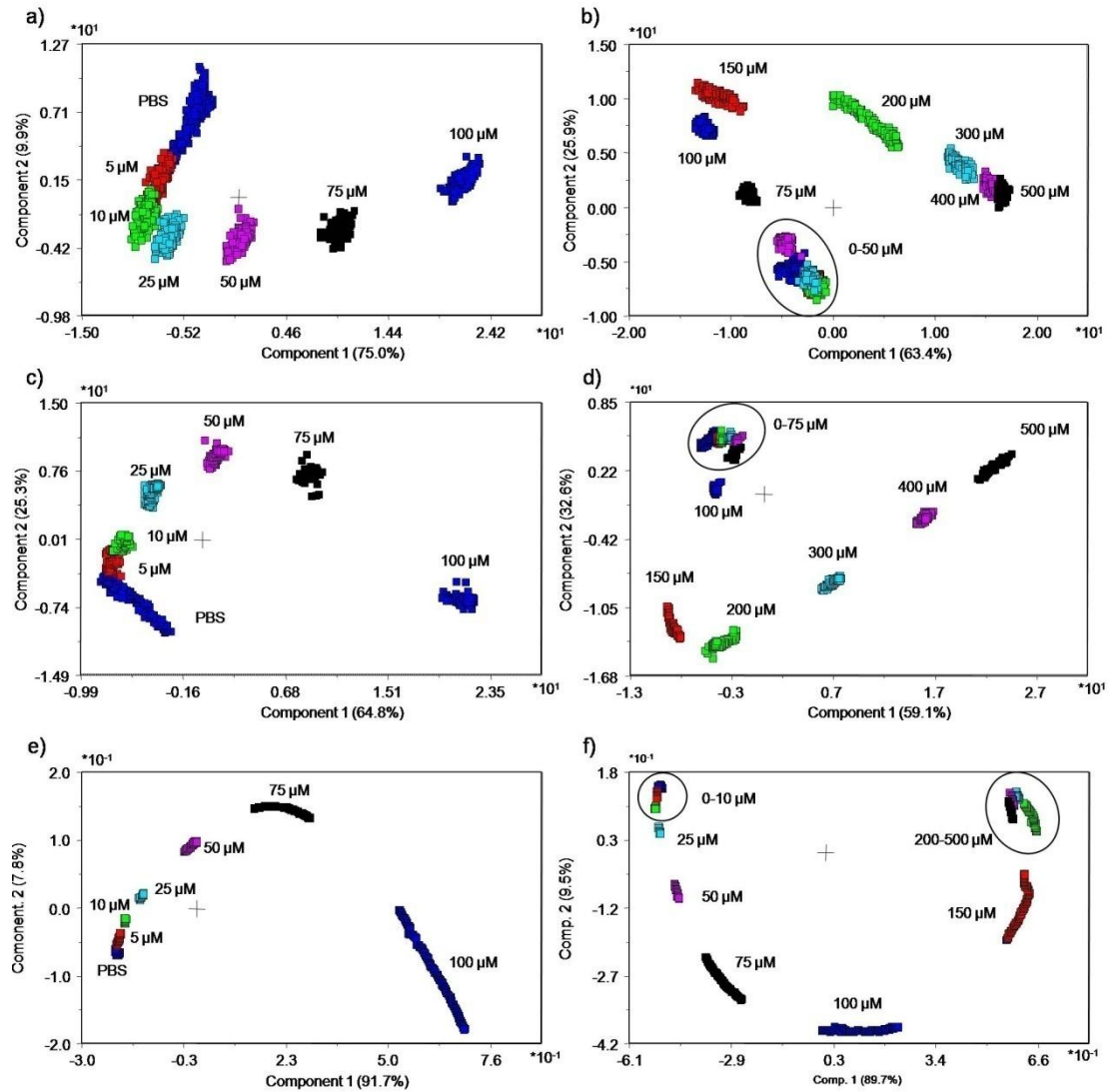


Figure 3. PCA plots of different concentrations of urea samples with the self-polishing voltammetric sensor (a) in the range 0-100 μM and (b) 0-500 μM . The same experiments but with an electrochemical cleaning step (c and d) and with no pretreatment (e and f), respectively.

3.2 Evaluation of fat content in milk

The self-polishing voltammetric sensor was also applied to a very complex and difficult media, milk. The evaluation of four different milks with various fat content (< 0.1 , 0.5 , 1.5 , and 3.0%)

was done and the raw data were processed by PCA, shown in Figure 4a. The scores plot shows that the four milk samples were clearly separated, with an explanation of 97.1% for the first component and 2.6% for the second one. The 200 measurements of each milk sample are randomly distributed in each cluster and no drift is thus detected. In the first component two groups are observed, one with the milks with fat contents of 0.5, 1.5 and 3 % and one with the milk with the lowest fat concentration (< 0.1 %). We can attribute this component to the differences between the voltammograms of both groups of milks. As shown in figure 5 the pulse responses show a current increase with increasing fat content, both for the capacitive current for the positive pulse and for the faradaic current for the negative pulse. The second principal component is correlated to the conductivity (5.67, 5.8, 5.60, and 5.31 mS for 0.1, 0.5, 1.5, and 3 % fat, respectively).

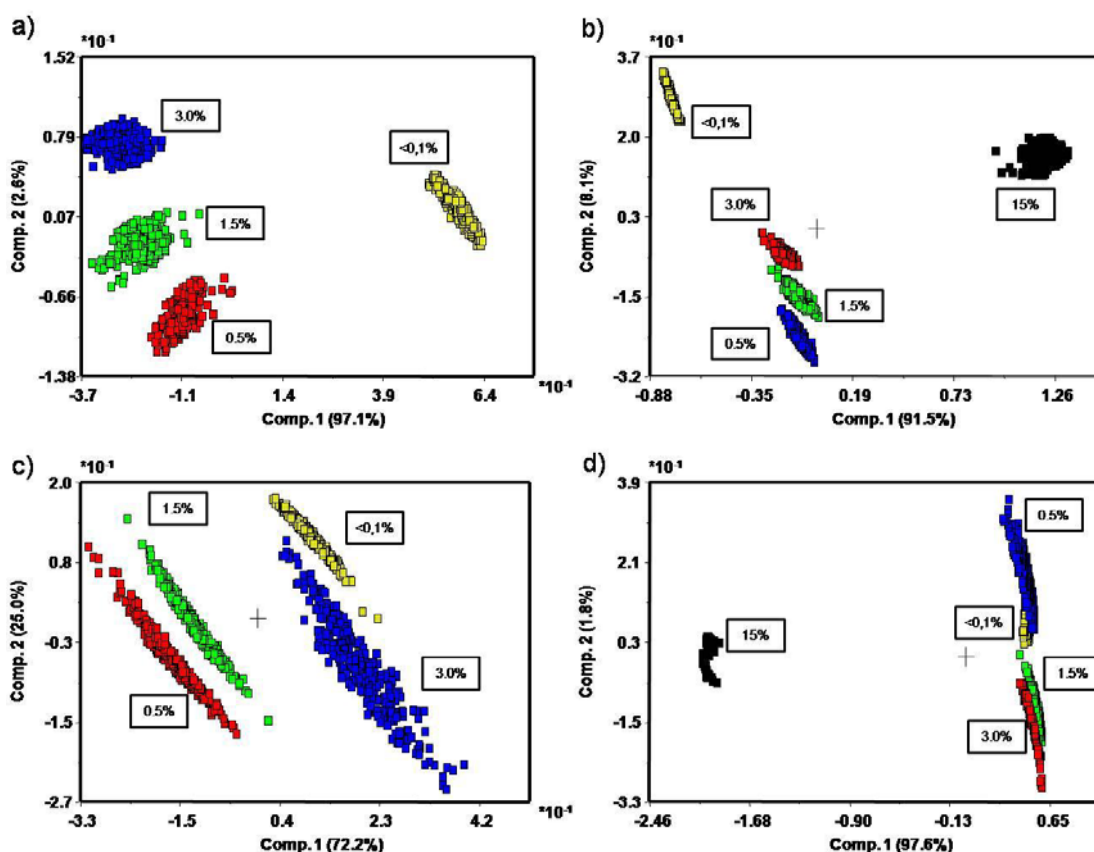


Figure 4. PCA plots of data collected with the self-polishing voltammetric sensor of milk samples with different fat concentrations (a) and the same milk samples plus a cream milk sample (b). PCA plots obtained with electrochemical cleaning for the different milk samples (c) and with cream milk (d).

Figure 4b shows the result of introducing a sample of cream milk with 15% fat in the PCA analysis. The PCA plot shows a clear difference between the different milks and the cream. In this analysis, the first principal component (91.5% of explained variance) separates cream milk, the milk with $< 0.1\%$ of fat, and the other milks. However, the second principal component (8.1% of explained variance) can distinguish all samples. In this case it is difficult to give an experimental meaning to the principal components, but we can obtain interesting information when the voltammograms of the different milks and the cream milk are compared (figure 5). First of all, both capacitive and faradaic currents are relevant for the explanation of the data, but the most important part is the first 10 ms of both negative and positive pulses. This can be due to that the milk has many compounds that can be reduced and/or oxidized and/or adsorbed at the surface of the working electrode during the application of the alternation between cathodic and anodic LAPV pulses.

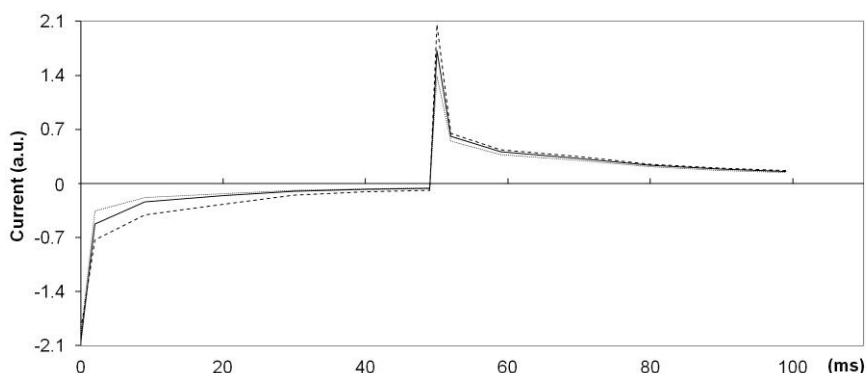


Figure 5. Part of the scan (-1.4 and 1.4 V pulses) of the milk and cream samples with the self-polishing mode. (···) $< 0.1\%$, (—) 3% and (---) 15% fat concentration.

To evaluate the effect of the grinding, the same experiments were carried out without grinding but with the application of electrochemical cleaning. In the PCA plot (figure 4c), the samples show a large drift, which is attributed to fouling of the electrode. Also the PCA plot, (figure 4d), where the cream milk is evaluated, shows that all samples have drift but the differentiation between the milk samples and cream is still possible, although in this case the milk measurements overlap. The application of electrochemical cleaning is not sufficient to avoid fouling of the surface. The self-polishing electronic tongue, on the other hand, can distinguish different fat contents in milks and cream milk and provides data with good repeatability and without data drift.

3.3 Sewage water

The properties of the voltammetric sensor were also evaluated analysing synthetic and real sewage water. A PCA for synthetic sewage water at different concentrations using a self-polishing sensor is shown in figure 6a. The data show separation between the evaluated concentrations (100 – 2500 ppm). The samples were separated basically along the first principle component (82.1% of explained variance), with the second component (9.1% of explained variance) contributing to an increased separation of the samples. The different samples are located in clusters indicating a good reproducibility. The only measurements that show drift were pure drinking water. This is, however, a sample drift due to the very low conductivity (and thus a susceptibility to environmental disturbances e.g. carbon dioxide uptake or electrochemically produced hydrogen ions) of the drinking water.

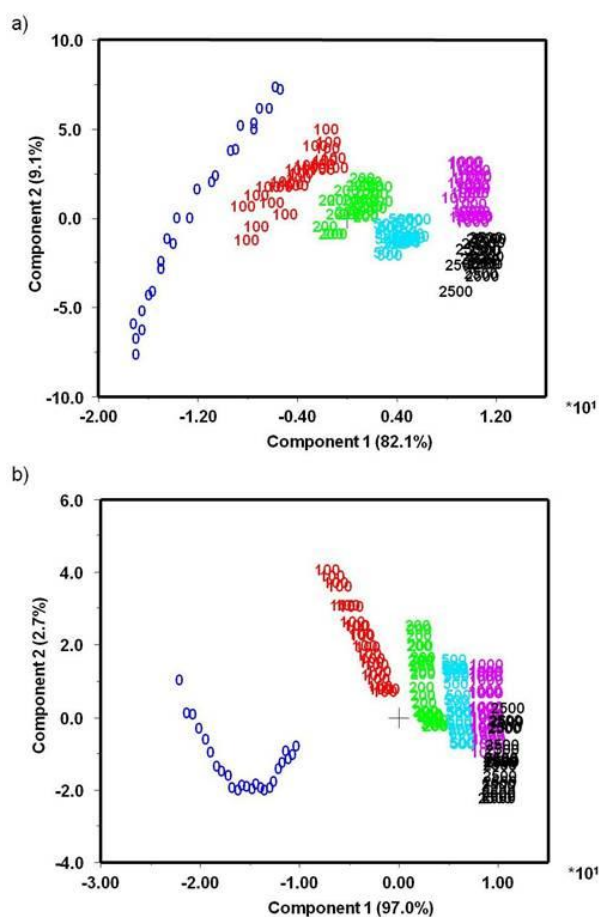


Figure 6. PCA plots of various concentrations of synthetic sewage water (0 – 2500 ppm) in drinking water measured with the self-polishing sensor device (a) and with the electrochemical cleaning step (b).

In the loading plot (not shown) the importance of the variables for each component is determined. The capacitive part of the -1.1 V pulse and the faradaic part of the +1.0 V pulse are

the most important variables in the explanation of PC1 which separates the different concentrations. This means that the most important contributions to the analysis are the oxidation currents, due to the oxidation of organic compounds, and the capacitive currents, due to the alternation between anodic and cathodic currents., This is similar to the previous milk study. The main contribution to PC2 is the middle part of the -1.1 V data. The data for electrochemical cleaning were also analysed by PCA. The scores plot is shown in figure 6b, and a drift was clearly observed for all concentrations. This behaviour did not appear when using the self-polishing device, indicating that the drift is due to electrode fouling occurring even when using electrochemical cleaning.

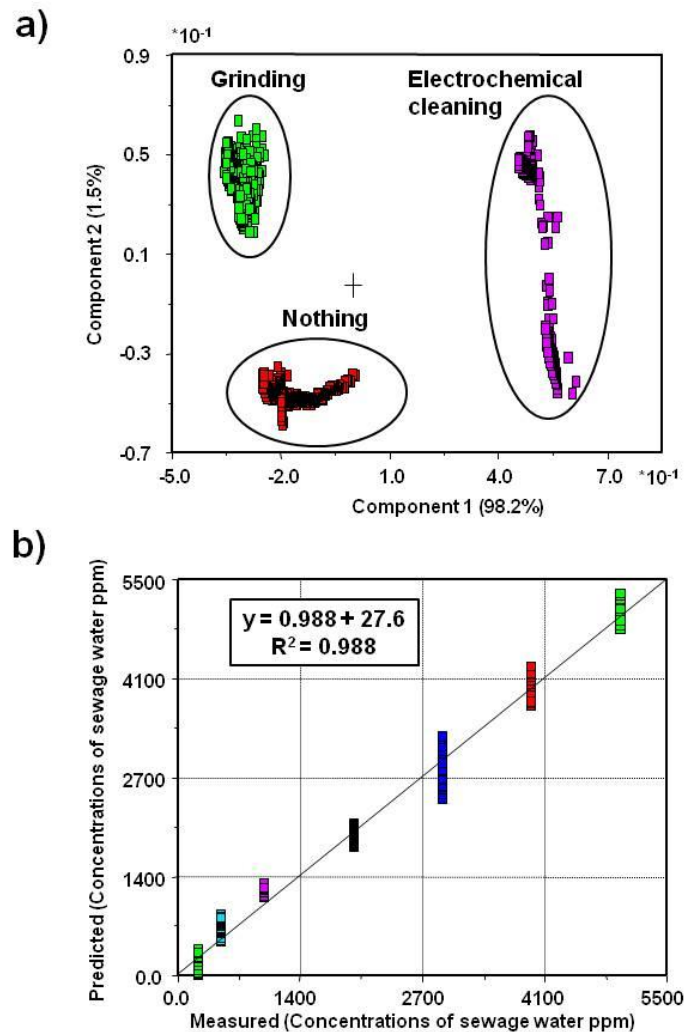


Figure 7. a) PCA plot of the different treatments for measurements of 500 ppm filtered sewage water. b) A PLS regression plot of measured vs. predicted concentrations of filtered sewage water (250 - 5000 ppm) in drinking water.

Since it was shown that the self-polishing VET was able to detect very low amounts of synthetic sewage water, the sensor was applied to real filtered sewage water from a water treatment plant,

and evaluated with PCA, shown in figure 7a, where 500 ppm of filtered sewage water in drinking water was analyzed and compared with grinding, electrochemical cleaning and no pretreatment. As can be seen, the grinding data form a cluster in the plot indicating good repeatability, but both electrochemical cleaning and no pretreatment measurements cause a drift in the plot. A drift is observed in the first principal component for no pretreatment, and in the second principal component for electrochemical cleaning. This means that electrode fouling occurs during analysis of the sewage water in both cases, but with no pretreatment electrode fouling was more severe (i.e. giving large drift along PC1) than with electrochemical cleaning.

A PLS model was built using cross-validation by the leave-one-out method. Two latent variables were used in order to establish a good predictive model for the determination of sewage water in drinking water. The PLS regression (figure 7b) presents a linear range between 250 – 5000 ppm of sewage water with a correlation coefficient of 0.988. The detection limit of the sensor in the filtered sewage water was found to be 250 ppm.

In the PLS analysis the most important variables are in the first 10 ms of the positive pulses and also with less weight the in the first 10 ms of the negative pulses. This means that the application of the alternation between cathodic and anodic LAPV pulses plays a key role for the analysis of sewage water. To build the PLS model, however, the oxidation of the different species in the sample also play an important role, as seen by the faradaic part of the positive pulses which has a considerable weight in the weighted regression coefficients.

4. Conclusions

Mechanical grinding of a platinum ring electrode in a voltammetric sensor results in a clean and reproducible working electrode. The circular shape permits constant measurement conditions resulting in good repeatability.

Regeneration of the electrode surface of voltammetric sensors is important since redox reaction products may accumulate at the electroactive surface during the experiments. Potentials that normally destroy the electrodes via oxidation or reduction are possible to use since the outermost layer of the surface is mechanically removed by the grinding. For this reason this self-polishing voltammetric sensor can be used with LAPV which offers a lot of information about the studied systems. In addition, the application of multivariate data analysis, like PCA and PLS, is well suited for the data evaluation.

Urea, which is a difficult analyte that adsorb to the surface and hinder further current exchange, can be measured with a good repeatability. It is, however, in the complex media, as the

determination of sewage water in drinking water and the evaluation of different fat contents in milk, where this new sensor shows a remarkably high capability to make repeatable measurements. The self-polishing sensor shows better results than the application of electrochemical cleaning, where sensor drift occurs, produced by electrode fouling. This self-polishing voltammetric sensor opens the possibility to measure also in other problematic media.

Acknowledgements

Santiago Cavanillas is grateful to MICINN for his Ph.D. grant (BES-2010-032352).

References

- [1] A. Riul Jr., C. A. R. Dantas, C. M. Miyazakic, O. N. Oliveira Jr., Recent advances in electronic tongues, *Analyst* 135 (2010) 2481–2495.
- [2] F. Winqvist, J. Olsson, M. Eriksson, Multicomponent analysis of drinking water by a voltammetric electronic tongue, *Anal. Chim. Acta* 683 (2011) 192–197.
- [3] C. Di Natale, A. Macagnano, F. Davide, A. D'Amico, A. Legin, Y. Vlasov, A. Rudnitskaya, B. Selezenev, Multicomponent analysis on polluted waters by means of an electronic tongue, *Sensor Actuat. B-Chem.* 44 (1997) 423–428.
- [4] F. Winqvist, Voltammetric electronic tongues – basic principles and applications, *Microchim. Acta* 163 (2008) 3–10.
- [5] F. Winqvist, P. Wide, I. Lundström, An electronic tongue based on voltammetry, *Anal. Chim. Acta* 357 (1997) 21–31.
- [6] F. Winqvist, S. Holmin, C. Krantz-Rülcker, P. Wide, I. Lundström, A hybrid electronic tongue, *Anal. Chim. Acta* 406 (2000) 147–157.
- [7] M. Frank, T. Hermle, H. Ulmer, J. Mitrovics, U. Weimar, W. Gopel, Quality tests of electronic noses: the influence of sample dilution and sensor drifts on the pattern recognition for selected case studies, *Sensor Actuat. B-Chem.* 65 (2000) 88–90.
- [8] S. Ampuero, J.O. Bossetm, The electronic nose applied to dairy products: a review, *Sensor Actuat. B-Chem.* 94 (2003) 1–12.

- [9] S. Holmin, C. Krantz-Rulcker, I. Lundstrom and F. Winqvist, Drift correction of electronic tongue responses, *Meas. Sci. Technol.* 12 (2001) 1348–1354.
- [10] P. Ivarsson, S. Holmin, N. E. Hojer, C. Krantz-Rülcker, I. Lundstrom, F. Winqvist, Discrimination of tea by means of a voltammetric electronic tongue and different applied waveforms *Sensors Actuat. B-Chem.* 76 1998 449–54.
- [11] T. Artursson, T. Eklöv, I. Lundström, P. Mårtensson, M Sjöström, M. Holmberg, Drift correction for gas sensors using multivariate methods, *J. Chemometrics* 14 (2000) 711–723.
- [12] S. Holmin, C. Krantz-Rulcker, F. Winqvist, Multivariate optimisation of electrochemically pre-treated electrodes used in a voltammetric electronic tongue, *Anal. Chim. Acta* 519 (2004) 39–46.
- [13] J. Olsson, F. Winqvist, I. Lundström, A self-polishing electronic tongue, *Sensor Actuat. B-Chem.* 118 (2006) 461–465.
- [14] A. David, S. Wessely, The legend of Camelford: medical consequences of a water pollution accident, *J. Psychosomatic Res.* 39 (1995) 1–9.
- [15] M. Eriksson, D. Lindgren, R. Bjorklund, F. Winqvist, H. Sundgren, I. Lundström, Drinking water monitoring with voltammetric sensors, *Procedia Eng.* 25 (2011) 1165-1168.
- [16] L. K. Limbach, R. Bereiter, E. Müller, R. Krebs, R. Gälli, W. J. Stark, Removal of oxide nanoparticles in a model wastewater treatment plant: Influence of agglomeration and surfactants on clearing efficiency, *Environ. Sci. Technol.* 42 (2008) 5828-5833.
- [17] L. Marincic, J. S. Soeldner, J. Giner, C. K. Colton Electrochemical Glucose Oxidation on a Platinized Platinum Electrode in Krebs-Ringer Solution, III . Effect of Urea, *J. Electrochem. Soc.* 126 (1979) 1687-1692

10.3. Discusión de resultados

El nuevo sensor desarrollado consiste en un aro de platino que actúa a modo de electrodo de trabajo, el cual está insertado en un cilindro de acero inoxidable usado como electrodo auxiliar. Ambos están conectados a un potenciostato controlado por un ordenador. Este enfoque hace que el uso de un electrodo convencional de referencia sea innecesario, puesto que el electrodo auxiliar funciona como un electrodo de pseudo-referencia. Este sensor tiene incorporado un sistema de pulido que pule físicamente y de forma constante los dos electrodos (figura 1a en el artículo), que se acciona por un motor eléctrico que transmite la acción mecánica a través de un eje.

La principal ventaja de este sensor es que la regeneración de la superficie evita la acumulación de los productos de reacción o la adsorción de otras especies en la superficie. Además, debido a su forma circular permitiría en teoría tener una superficie con las mismas condiciones durante todo el análisis, obteniendo medidas estables sin observar el equilibrado de la medida que normalmente se produce después de aplicar una etapa de pulido a un electrodo. La elección del material del electrodo es de crucial importancia debido a que las propiedades catalíticas, la sorción o adsorción química, la homogeneidad y la uniformidad tienen una alta influencia en su comportamiento, por ello se selecciono el platino como material para el sensor.

Las medidas se llevaron a cabo por la técnica voltamperométrica de impulsos de gran amplitud (LAPV), donde se obtiene información de las contribuciones farádicas y no farádicas de los sistemas. Se optimizaron los impulsos aplicados, en los cuales se alternan impulsos catódicos y anódicos. Gracias a la eliminación mecánica de la capa más externa de la superficie se pudieron aplicar potenciales que normalmente destruirían la superficie debido a la oxidación o reducción de la misma. Posteriormente, los conjuntos de datos se analizaron quimiométricamente mediante PCA y PLS.

Con el objetivo de evaluar la eficiencia del autopulido, se compararon los resultados obtenidos tras i) la aplicación de la unidad de autopulido; ii) la aplicación de una etapa de limpieza electroquímica; iii) y sin aplicar ningún pretratamiento en la superficie del sensor. A continuación se exponen los resultados obtenidos para cada sistema estudiado.

Análisis de diferentes concentraciones de urea

La urea es un analito difícil, ya que presenta importantes efectos de adsorción en el sensor de Pt. Tras unas pruebas preliminares se observaron dos comportamientos diferentes de la urea en el electrodo en función de la concentración que quedan reflejados en el posterior tratamiento quimiométrico mediante PCA.

Para la evaluación del dispositivo de autopulido se realizaron una serie de medidas en disoluciones con diferentes concentraciones de urea y los datos fueron analizados mediante PCA. En la gráfica de *scores* a bajas concentraciones (Figura 3a del artículo) se observa una buena separación de las concentraciones a partir de $10 \mu\text{mol L}^{-1}$. Las medidas a cada concentración forman clústeres y no se observa deriva en ellas, siendo reproducibles hasta una concentración de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$.

Se repitió el mismo estudio y tratamiento quimiométrico aplicando una etapa de limpieza electroquímica entre cada medida y finalmente se procedió de igual manera pero sin aplicar ningún tratamiento en la superficie del electrodo. Durante la aplicación de la limpieza electroquímica se observa en el gráfico de *scores* un comportamiento parecido al encontrado en la aplicación del sistema de autopulido (Figura 3c y 3d del artículo), siendo reproducibles las medidas hasta una concentración de $150 \mu\text{mol L}^{-1}$. En cambio, al no aplicar ningún tratamiento en la superficie del electrodo se observa una clara desviación en las medidas, la cual se incrementa hasta una concentración de $200 \mu\text{mol L}^{-1}$. A partir de esta concentración el electrodo parece estar saturado (Figura 3f del artículo). Así pues, los resultados no muestran una especial eficiencia del sistema de autopulido frente a la aplicación de la limpieza electroquímica, pero la aplicación de un tratamiento en la superficie del sensor durante la determinación de urea sí resulta imprescindible.

Clasificación de muestras de leche según su contenido en grasa

El sensor voltamperométrico con autopulido se aplicó a muestras de leche, una matriz especialmente compleja y difícil de analizar. El estudio consiste en la evaluación del electrodo para la clasificación de diferentes muestras de leche según su contenido en grasa. Para ello, se introdujo directamente el sensor en muestras de leche con diferentes concentraciones de grasa (<0,1, 0,5, 1,5 y 3,0%) y de crema de leche con un 15% en contenido graso.

El estudio realizado con el sistema de pulido proporciona, tras el análisis por PCA, una buena separación de las muestras de leche por su contenido en grasa (Figura 4a del artículo). Además las medidas son reproducibles en todos los casos. También se evaluaron las muestras de leche junto a la crema de leche mediante PCA y se observa en el gráfico de *scores* como las diferentes muestras forman clústeres y se pueden distinguir tanto las muestras de leche como la de crema (Figura 4b del artículo).

A continuación, se aplicó la limpieza electroquímica al mismo estudio. El gráfico de *scores* del tratamiento por PCA de las muestras de leche muestra una gran desviación de los datos (Figura 4c del artículo), lo cual se atribuye al ensuciamiento del electrodo. Al añadir a la matriz de datos experimentales las medidas de la crema de leche se sigue observando una gran deriva de los datos, diferenciando sólo entre las muestras de leche y la de crema de leche (Figura 4d del artículo). Con estos resultados se puede concluir que la aplicación del dispositivo de autopulido a este sensor, permite distinguir entre diferentes contenidos de grasa en muestras de leche e incluso de crema de leche. Además de mantener la superficie limpia del sensor, el sistema de autopulido permite obtener medidas con una buena reproducibilidad y no se observa deriva en los datos.

Detección y análisis de la presencia de aguas residuales en aguas de consumo

Por último, el sensor voltamperométrico con su dispositivo de autopulido fue evaluado para la detección y análisis de la presencia de aguas residuales en aguas de consumo. Para ello se aplicó inicialmente a una disolución de agua residual sintética y posteriormente a muestras de aguas residuales obtenidas en una planta de tratamiento de agua en Linköping.

Inicialmente, se estudió la capacidad de obtener medidas estables y sin desviaciones en este sistema aplicando el sensor con el dispositivo de autopulido y comparando los resultados con los obtenidos al aplicar una etapa de limpieza electroquímica o sin aplicar ningún pretratamiento en la superficie del electrodo. Para ello se analizaron mediante PCA las medidas obtenidas de manera continua en una disolución de 500 ppm de aguas residuales en agua de consumo. En este punto, indicar que el termino concentración de agua residual se refiere al volumen de agua residual (sintética o real) respecto al volumen total de disolución (agua residual más agua potable), expresado en μL agua residual en L de disolución. En todo este trabajo esta relación se nombra como ppm.

En el gráfico de *scores* (Figura 7a del artículo) se observa que las medidas obtenidas utilizando el sistema de autopulido forman un clúster, lo cual indica una buena repetitividad. En cambio, los datos obtenidos tras la limpieza electroquímica o en ausencia de pretratamiento muestran una desviación evidente en las medidas con el paso del tiempo. Esto significa, que en ambos casos se produce un deterioro del electrodo durante el análisis de las aguas residuales. Hay que señalar, no obstante, que la deriva es menos grave para la limpieza electroquímica ya que es explicada por el PC2.

Tras constatar la necesidad de un pretratamiento para el análisis de este sistema, se analizaron diferentes concentraciones de aguas residuales sintéticas (100 - 2500 ppm) comparando el dispositivo de autopulido con una etapa de limpieza electroquímica. En el primer caso (Figura 6a del artículo) se distinguen las diferentes concentraciones evaluadas mostrando una buena reproducibilidad de las medidas y sin reflejar una deriva significativa, salvo en el caso de la medida de agua potable de muy baja conductividad (y por lo tanto susceptible a las perturbaciones ambientales como la captación de dióxido de carbono o iones de hidrógeno producidos electroquímicamente). En estas medidas la deriva está causada por la muestra y no por el deterioro de la superficie del electrodo. El mismo análisis se llevó a cabo aplicando una etapa de limpieza electroquímica y los resultados observados tras el análisis por PCA (Figura 6b del artículo) muestran claramente una desviación de las medidas producidas por el deterioro en la superficie electroquímica.

Finalmente, se construyó un modelo de predicción PLS usando la validación cruzada mediante el método *leave one out*. Las medidas se llevaron a cabo utilizando el sensor con el dispositivo de autopulido midiendo muestras de agua potable con diferentes concentraciones de aguas residuales reales (250 y 5000 ppm) (Figura 7b del artículo). En este rango de concentraciones se obtuvo un coeficiente de correlación de 0,988 y se estimó el límite de detección en 250 ppm.

Parte V.

Conclusiones

1. The new chemometric methodology here proposed, based on the parametric signal fitting by gaussian peak adjustment (PSF-GPA), appears to be a promising strategy for the multivariate curve resolution (MCR) of non-bilinear data with characteristic signal patterns susceptible to be modelled by parametric functions. The use of this algorithm has successfully modelled the progressive potential shift and broadening of voltammetric data. In the design of these functions, it was crucial to use parameters that can be easily related to the height, area, position and width of the signal for the sake of a fast optimization and a straightforward interpretation of the results. GPA method has been successfully applied to linear and non-linear voltammetric data of different metal-ligand systems. The satisfactory results in the identification of chemical models reveal GPA as an excellent method to solve intricate and non-linear voltammetric data.
2. The implementation of transversal constraints in the GPA2D program (based also on the GPA approach) has significantly improved the results of the existing methods (unconstrained GPA, *pHfit* and MCR-ALS), increasing the consistency of the different voltammograms, which are adjusted together. This is especially true when it is applied to non-bilinear voltammetric datasets.
3. Inside GPA2D, the signals-shift constraint has been successfully tested in the analysis of the PC₂ and Cd(II)/PC₂ systems. It provides a better resolution with a lower lack of fit than a previous *pHfit* analysis.
4. The chemical equilibrium constraint of GPA2D has been successfully tested with Zn(II)/oxalate and Cd(II)/1,10-phenantroline systems obtaining a good agreement with the values of the stability constants found in the literature. Additionally, the equilibrium mode of GPA2D has been applied to Cu(II)/BAP system, with scarce complexation data available, and has provided reliable electrochemical values for the stability constants.
5. The analysis by GPA of the complexation voltammetric data of ternary metal mixtures with phytochelatins shows that copper has more affinity for them than cadmium and lead. Also, these studies suggest that Pb²⁺ is excluded from PC_n complexes in the presence of both Cd(II) and Cu(II). The ESI-MS studies confirm the main GPA results concerning the behavior of Cd²⁺, Cu²⁺ and Pb²⁺ in the presence of different PC₂ or PC₅ ratios and also point out the presence of ternary complexes

with PC_2 and PC_5 and quaternary complexes with PC_5 . The signal evolution for mixed $CdCuPC_n$ complexes is quite different and a dependence upon the number of thiol groups is verified. These observations could be a reflection of an antagonistic effect for the case of PC_2 and a synergetic one for PC_5 .

6. The complexation of As(III) with the chelating therapy agents DMSA and DMPS has been successfully studied by a multiple approach combining ITC, ESI-MS and voltammetry supported by GPA algorithm yielding a reliable and consistent picture of the binding of As(III) by DMSA and DMPS. In the study of the complexation of As(III) with DMSA two stoichiometries were obtained by all techniques: ML and ML_2 , with values of $\log \beta_1 = 4.7$ and $\log \beta_2 = 9.2$ determined by ITC. However, when DMPS was considered only the ML_2 complex appears by all techniques applied with a $\log \beta_2$ of 9.8 (the ML complex was only obtained by ESI-MS). The high stability of the predominant ML_2 complexes indicates the effectiveness of DMSA and DMPS in the treatment of As(III) poisoning.
7. The complexation study of the Cu(II)/BAP system by voltammetry yields two sets of experimental data that contain serious uncertainties. In the case of Cu(II) to BAP titration, both the insensitivity of the BAP reduction signal to the complexation process and the selectivity problems between the anodic and the free metal reduction-signals were solved with the DPP-UVvis combined MCR-ALS analysis. In the case of BAP to Cu(II) titration, the voltammetric data present a dramatic loss of linearity due to the large potential shift of the complex signals. Thus, the application of the new chemometric strategy to non-bilinear voltammetric data by GPA analysis allowed us to confront these difficulties. The overall picture of this study shows the formation of two successive complexes of stoichiometries 1:1 and 1:2 Cu(II):BAP, depending of the metal-to-ligand ratio. This complexation model was confirmed by ESI-MS.
8. The implementation of a mechanical grinding on a platinum ring electrode results in a clean and reproducible working electrode for voltammetric measurements. The circular shape of the electrode surface permits constant measurement conditions resulting in a good repeatability. This self-polishing voltammetric sensor opens the possibility to measure in different problematic media avoiding sensor drift produced by electrode fouling.

9. The self-polishing voltammetric sensor shows better results than the application of an electrochemical cleaning previous to the measure. In this last case a drift due to the sensor fouling occurs. Considering the three studied systems, in the case of urea both cleaning strategies give similar results. In contrast, in the determination of sewage water in drinking water and the evaluation of different fat contents in milk the new sensor exhibits a remarkably high capability to make repeatable measurements.

Parte VI.

Bibliografía

1. S. D. Brown, R. S. Bear Jr., *Chemometric Techniques in Electrochemistry: A Critical Review*, Crit. Rev. Anal. Chem., 24 (1993) 99.
2. V. Pravdova, M. Pravda, G. G. Guilbault, *Role of chemometrics for electrochemical sensors*, Anal. Lett., 35 (2002) 2389.
3. E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Multivariate Data Analysis in Electroanalytical Chemistry*, Electroanalysis, 14 (2002) 1533.
4. M. Esteban, C. Ariño, J.M. Díaz-Cruz, *Chemometrics in Electroanalytical Chemistry*, Crit. Rev. Anal. Chem., 36 (2006) 295.
5. Y. Ni, S. Kokot, *Does chemometrics enhance the performance of electroanalysis?*, Anal. Chim. Acta, 626 (2008) 130.
6. M. del Valle, *Electronic Tongues Employing Electrochemical Sensors*, Electroanalysis, 22 (2010) 1539.
7. B. K. Lavine, J. Workman, *Chemometrics*, Anal. Chem., 85 (2013) 705.
8. M. Peris, L. E. Gilabert, *On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: a review*, Anal. Chim. Acta, 804 (2013) 29.
9. M. J. Gómez, O. Domínguez, O. M. J. Arcos, *Speciation of antimony by Adsorptive Stripping Voltammetry using Pyrogallol*, Talanta, 71 (2007) 691.
10. J. A. Jurado, M. D. Galindo-R, M. García-Vargas, *Experimental designs in the development of a new method for the sensitive determination of cadmium in seawater by adsorptive cathodic stripping voltammetry*, Anal. Chim. Acta, 487 (2003) 229.
11. A. Savitzky, M. J. E. Golay, *Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures*, Anal. Chem., 36 (1964) 1627.
12. C. A. Scolari, S. D. Brown, *Multicomponent determinations in flow-injection systems with square-wave voltammetric detection using the Kalman filter*, Anal. Chim. Acta, 178 (1985) 239.
13. B. S. Grabaric, R. J. O'Halloran, D. E. Smith, *Resolution enhancement of a.c. polarographic peaks by deconvolution using the fast fourier transform*, Anal. Chim. Acta, 133 (1981) 349.

14. J. N. Miller, J. C. Miller, *Estadística y quimiometría para química analítica*, Pearson Education, Madrid (2002).
15. C. Krantz-Rülcker, M. Stenberg, F. Winqvist, I. Lundström, *Electronic tongues for environmental monitoring based on sensor arrays and pattern recognition: a review*, *Anal. Chim. Acta*, 426 (2001) 217.
16. J. Gallardo, S. Alegret, M. del Valle, *Application of a potentiometric electronic tongue as a classification tool in food analysis*, *Talanta*, 66 (2005) 1303.
17. E. A. Baldwin, J. Bai, A. Plotto, S. Dea, *Electronic noses and tongues: applications for the food and pharmaceutical industries*, *Sensors*, 11 (2011) 4744.
18. C. Södetström, F. Winqvist, C. Krantz-Rülcker, *Recognition of six microbial species with an electronic tongue*, *Sensor Actuat B-Chem*, 89 (2003) 248.
19. O. Domínguez, M. J. Arcos, *Simultaneous determination of chromium(VI) and chromium(III) at trace levels by adsorptive stripping voltammetry*, *Anal. Chim. Acta*, 470 (2002) 241.
20. A. Herrero, M.C. Ortiz, *Multivariate calibration transfer applied to the routine polarographic determination of copper, lead, cadmium and zinc*, *Anal. Chim. Acta*, 348 (1997) 51.
21. R. Knake, R. Guchardi, P. C. Hauser, *Quantitative analysis of gas mixtures with a voltammetric gas sensor*, *Anal. Chim. Acta*, 475 (2003) 17.
22. T. G. Díaz, A. G. Cabanillas, F. Salinas, *Square-wave and differential pulse oxidative voltammetric determination of diquat and paraquat in alkaline medium*, *Electroanalysis*, 12 (2000) 616.
23. M.E. Rueda, L.A. Sarabia, A. Herrero, M.C. Ortiz, *Soft calibration in a flow system with electrochemical detection – Application to the determination of phenolic compounds*, *Anal. Chim. Acta*, 446 (2001) 269.
24. F. Despagne, D. L. Massart, *Tutorial Review: Neural Networks in Multivariate Calibration*, *Analyst*, 123 (1998) 157.

25. E. Richards, C. Bessant, S. Saini, *Optimisation of a neural network model for calibration of voltammetric data*, Chemom. Intell. Lab. Syst., 61 (2002) 35.
26. I. Cukrowski, J. Havel, *Evaluation of Equilibria with a Use of Artificial Neural Networks (ANN): I. Artificial Neural Networks and Experimental Design as a Tool in Electrochemical Data Evaluation for Fully Inert Metal Complexes*, Electroanalysis, 12 (2000) 1481.
27. I. Cukrowski, M. Farkova, J. Havel, *Evaluation of Equilibria with Use of Artificial Neural Networks (ANN). II. ANN and Experimental Design as a Tool in Electrochemical Data Evaluation for Fully Dynamic (Labile) Metal Complexes*, Electroanalysis, 13 (2001) 295.
28. W. H. Lawton, E. A. Sylvestre, *Self Modeling Curve Resolution*, Technometrics, 13 (1971) 617.
29. E. A. Sylvestre, W. H. Lawton, M. S. Maggio, *Curve Resolution Using a Postulated Chemical Reaction*, Technometrics, 16 (1974) 353.
30. A. de Juan, E. Casassas, R. Tauler, in R. A. Meyers (ed.), *Encyclopedia of Analytical Chemistry. Applications, Theory, and Instrumentations*, John Wiley & Sons, New York (2000).
31. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, in S. D. Brown, R. Tauler and B. Walczak (eds.), *Comprehensive Chemometrics* vol. 4, *Chemical and Biochemical Data Analysis*, Elsevier Science, Oxford (2009).
32. J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, B. S. Grabaric, M. Esteban, E. Casassas, *Application of multivariate curve resolution to voltammetric data. Part 1. Study of Zn(II) complexation with some polyelectrolytes*, J. Electroanal. Chem., 393 (1995) 7.
33. R. Tauler, A. Izquierdo-Ridorsa, E. Casassas, *Simultaneous analysis of several spectroscopic titrations with self-modeling curve resolution*, Chemom. Intell. Lab. Syst., 18 (1993) 293.
34. A. de Juan, Y. V. Heyden, R. Tauler, D. L. Massart, *Assessment of New Constraints Applied to the Alternating Least Squares (ALS) Method*, Anal. Chim. Acta, 346 (1997) 307.

35. J. Mendieta, M. S. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Application of multivariate curve resolution to voltammetric data: II. Study of metal-binding properties of the peptides*, Anal. Biochem. 240 (1996) 134.
36. J. M. Díaz-Cruz, J. Agulló, M. S. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, R. Tauler, *Implementation of a Chemical Equilibrium Constraint in the Multivariate Curve Resolution of Voltammograms from Systems with Successive Metal Complexes*, The Analyst, 126 (2001) 371.
37. M. S. Díaz-Cruz, M. J. López, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Comparison of the Zinc-Cadmium Exchange Properties of the Metallothionein Related Peptide {Lys-Cys-Thr-Cys-Cys-Ala} and a Zinc-Containing Metallothionein: Study by Voltammetry and Multivariate Curve Resolution*, J. Electroanal. Chem., 523 (2002). 114.
38. M. C. Antunes, J. E. Simão, A. C. Duarte, M. Esteban, R. Tauler, *Application of multivariate curve resolution to the voltammetric study of the complexation of fulvic acids with cadmium (II) ions*, Anal. Chim. Acta, 459 (2002) 291.
39. R. Gusmão, S. Cavanillas, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Circular Dichroism and Voltammetry, assisted by Multivariate Curve Resolution, and Mass Spectrometry of the competitive metal binding by phytochelatin PC₅*, Anal. Chem., 82 (2010) 9006.
40. B. S. Grabaric, Z. Grabaric, R. Tauler, M. Esteban, E. Casassas, *Application of multivariate curve resolution to the voltammetric data. Factor analysis ambiguities in the study of weak consecutive complexation of metal ion with ligand*, Anal. Chim. Acta, 341 (1997) 105.
41. M. Fernández, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, R. Tauler, M. Esteban, *Soft modelling approach applied to voltammetric data: study of electrochemically labile metal–glycine complexes*, J. Electroanal. Chem., 505 (2001) 44.
42. A. Alberich, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Multivariate curve resolution applied to the simultaneous analysis of electrochemical and spectroscopic data: Study of the Cd(II) / glutathione-fragment system by voltammetry and circular dichroism spectroscopy*, Anal. Chim. Acta, 584 (2007) 403.

43. D. D. DeFord, D. N. J. Hume, *The Determination of Consecutive Formation Constants of Complex Ions from Polarographic Data*, J. Amer. Chem. Soc., 73 (1951) 5321.
44. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, K. Holub, *Voltammetry of metal complex systems with different diffusion coefficients of the species involved: Part I. Analytical approaches to the limiting current for the general case including association/dissociation kinetics*, J. Electroanal. Chem., 234 (1987) 1.
45. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, *Voltammetry of metal complex systems with different diffusion coefficients of the species involved. Part II. Behavior of the limiting current and its dependence on association/dissociation kinetics and lability*, J. Electroanal. Chem., 234 (1987) 17.
46. H. G. de Jong, H. P. van Leeuwen, *Voltammetry of metal complex systems with different diffusion coefficients of the species involved. Part III. The current-potential relation for the general case including association/dissociation kinetics*, J. Electroanal. Chem., 235 (1987) 1.
47. C. Ruckebusch, L. Blanchet, *Multivariate curve resolution: A review of advanced and tailored applications and challenges*, Anal. Chim. Acta, 765 (2013) 28.
48. L. W. Hantao, H. G. Aleme, M. P. Pedroso, G. P. Sabin, R. J. Poppi, F. Augusto, *Multivariate curve resolution combined with gas chromatography to enhance analytical separation in complex samples: A review*, Anal. Chim. Acta, 731 (2012) 11.
49. A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Potential shift correction in multivariate curve resolution of voltammetric data. General formulation and application to some experimental systems*, Analyst, 133 (2008) 112.
50. A. Alberich, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Combined use of the potential shift correction and the simultaneous treatment of spectroscopic and electrochemical data by multivariate curve resolution: Analysis of a Pb(II)-phytochelatin system*, Analyst, 133 (2008) 470.
51. J. M. Díaz-Cruz, J. Sanchís, E. Chekmeneva, C. Ariño, M. Esteban, *Non-linear multivariate curve resolution analysis of voltammetric pH titrations*, Analyst, 135 (2010) 1653.

52. C. Baird, *Química ambiental*, Reverté, Barcelona (2001).
53. A. Tessier, D. R. Turner, *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons, Chichester (1995).
54. G. Rayner-Canham, *Química inorgánica descriptiva*, Prentice Hall, México (2000).
55. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs372/es/>
56. World Health Organization, 1997. *Arsenic in drinking water and resulting arsenic toxicity in India and Bangladesh: recommendation for action*. SEA/EH/505.
57. B. K. Mandal, K. T. Suzuki, *Arsenic round the world: a review*, *Talanta*, 58 (2002) 201.
58. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/>
59. W. Salomons, U. Forstner, *Heavy metals. Problems and solutions*, Springer-Verlag, Berlin (1995)
60. G. F. Nordberg, *Historical perspectives on cadmium toxicology*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 238 (2009) 192.
61. L. M. Gaetke, C. K. Chow, *Copper toxicity, oxidative stress, and antioxidant nutrients*, *Toxicology*, 189 (2003) 147.
62. F. B. Zuñiga, *Introducción al estudio de la contaminación de suelos por metales pesados*, UADY, Mexico (1999).
63. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/copper/en/
64. A. Kabata-Pendias, H. Pendias, *Trace Elements in Soils and Plants*, CRC Press, USA (2001).
65. A. E. Martell, R. D. Hancock, *Metal Complexes in Aqueous Solutions*, Plenum Press, New York, 1996.
66. P. C. Jocelyn, *Biochemistry of the SH group*, Academic Press, London, New York (1974).

67. J. Buffle, *Complexation Reactions in Aquatic Systems: an Analytical Approach*, Ellis Horwood, Chichester (1988).
68. W. Henderson, J. S. McIndoe, *Mass Spectrometry of Inorganic and Organometallic Compounds*, John Wiley & Sons, Chichester (2005).
69. J. E. Ladbury, B. Z. Chowdry, *Biocalorimetry, Applications of Calorimetry in Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Chichester (1998).
70. E. Pilon-Smits, *Annu. Phytoremediation, Rev. Plant Biol.*, 56 (2005) 15.
71. E. Grill, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Phytochelatins: the principal heavy-metal complexing peptides of higher plants*, *Science*, 230 (1985) 674.
72. R. Knerr, M. H. Zenk, *The formation of Cd-phytochelatin complexes in plant cell cultures*, *Phytochemistry*, 44 (1997) 69.
73. N. Tsuji, N. Hirayanagi, M. Okada, H. Miyasaka, K. Hirata, M. H. Zenk, K. Miyamoto, *Enhancement of tolerance to heavy metals and oxidative stress in *Dunaliella tertiolecta* by Zn-induced phytochelatin synthesis*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 292 (2002) 653.
74. E. Grill, S. Loeffler, E-L. Winnacker, M. H. Zenk, *Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase)*, *Proc. Acad. Sci. USA*, 86 (1989) 6838.
75. O. K. Vatamaniuk, S. Mari, Y-P. Lu, P. A. Rea, *Mechanism of heavy metal ion activation of phytochelatin (PC) synthase: blocked thiols are sufficient for PC synthase-catalyzed transpeptidation of glutathione and related thiol peptides*, *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 31451.
76. J. P. K. Rooney, *The role of thiols, dithiols, nutritional factors and interacting ligands in the toxicology of mercury*, *Toxicology*, 234 (2007) 145.
77. G. P. Guzzi, C. A. M. La Porta, *The Role of Chelation in the Treatment of Arsenic and Mercury Poisoning*, *J Med Toxicol.*, 9 (2013) 347.

78. L. A. Stocken, R. H. S. Thompson, *Reactions of British anti-Lewisite with arsenic and other metals in living systems*, *Physiol. Rev.*, 29 (1949) 168.
79. <http://www.dmpsbackfire.com/>
80. D. N. Guha Mazumder, U. C. Goshal, J. Saha, A. Santra, B. K. De, A. Chatterjee, S. Dutta, C. R. Angle, J. A. Centeno, *Randomized placebo controlled trial of 2,3-dimercaptosuccinic acid in therapy of chronic arsenicosis due to drinking arsenic contaminated subsoil water*, *J. Toxicol. Clin. Toxicol.*, 36 (1998) 683-690.
81. H. V. Aposhian, B. Zheng, M. M. Aposhian, X. C. Le, M. E. Cebrian, W. Cullen, R. A. Zakharyan, M. Ma, R. C. Dart, Z. Cheng, P. Andrewes, L. Yip, G. F. O'Malley, R. M. Maiorino, W. van Voorhies, S. M. Healy, A. Titcomb, *DMPS-arsenic challenge test II. Modulation of arsenic species, including monomethylarsonous acid (MMAIII), excreted in human urine*, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 165 (2000) 74-83.
82. H. V. Aposhian, M. M. Aposhian, *Arsenic toxicology: five questions*, *Chem. Res. Toxicol.*, 19 (2006) 1.
83. M. Strnad, *The aromatic cytokinins*, *Physiol. Plant.*, 101 (1997) 674.
84. J. Malá, P. Máchová, H. Cvrčková, M. Karady, O. Novák, J. Mikulík, E. Hauserová, J. Greplová, M. Strnad, K. Doležal, *Micropropagation of Wild Service Tree (Sorbus torminalis [L.] Crantz): The Regulative Role of Different Aromatic Cytokinins During Organogenesis*, *J. Plant. Growth Regul.*, 28 (2009) 341.
85. M. W. Siddiqui, A. Bhattacharjya, I. Chakraborty, R. S. Dhua, *6-Benzylaminopurine improves shelf life, organoleptic quality and health-promoting compounds of fresh-cut broccoli florets*, *J. Sci. Ind. Res.*, 70 (2011) 461.
86. K. Doležal, I. Popa, V. Kryštof, L. Spíchal, M. Fojtíková, J. Holub, R. Lenobel, T. Schmülling, M. Strnad, *Preparation and biological activity of 6-benzylaminopurine derivatives in plants and human cancer cells*, *Bioorg. Med. Chem.*, 14 (2006) 875.
87. Z. Dvořák, P. Starha, Z. Trávníček Z., *Evaluation of in vitro cytotoxicity of 6-benzylaminopurine carboplatin derivatives against human cancer cell lines and primary human hepatocytes*, *Toxicol In Vitro*, 25 (2011) 652.

88. M. Malon, Z. Travnicek, M. Marysko, J. Marek, K. Dolezal, J. Rolcik and M. Strnad, *Synthesis, characterization and antitumour activity of copper(II) 6-(4-chlorobenzylamino) purine complexes. X-ray structure of 6-(4-chlorobenzylamino)purinium perchlorate*, *Transition Met. Chem.*, 27 (2002) 580.
89. A. Klanicová, Z. Trávníček, J. Vanco, I. Popa, Z. Šindelár, *Dinuclear Copper(II) Perchlorate Complexes with 6-(benzylamino)purine Derivatives: Synthesis, X-ray Structure, Magnetism and Antiradical Activity*, *Polyhedron*, 29 (2010) 2582.
90. M. Maloň, A. Trávníčka, M. Maryškob, R. Zbořilc, M. Mašlánc, J. Marekd, K. Doležale, J. Rolčíke, V. Kryštofe, M. Strnade, *Metal complexes as anticancer agents 2. Iron(III) and copper(II) bio-active complexes with N6-benzylaminopurine derivatives*, *Inorg. Chim. Acta*, 323 (2001) 119.
91. J. P. R. Riches, *An introduction to polarographic methods and their application to the analysis of plant material*, *New Phytol.*, 47 (1948) 1.
92. A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Electrochemical Methods. Fundamentals and Applications*, John Wiley and sons, New York (2001).
93. P. C. White, N. S. Lawrence, J. Davis, R. G. Compton, *Electrochemical determination of thiols: A perspective*, *Electroanalysis*, 14 (2002) 89.
94. M. Heyrovský, P. Mader, S. Vavříčka, V. Veselá, M. Fedurco, *The anodic reactions at mercury electrode due to cysteine*, *J. Electroanal Chem.*, 430 (1997) 103.
95. W. Stricks, I. M. Kolthoff, *Polarography of glutathione*, *J. Am. Chem. Soc.*, 74 (1952) 4646.
96. M. S. Díaz-Cruz, J. M. Díaz-Cruz, J. Mendieta, R. Tauler, M. Esteban, *Soft- and Hard-Modeling Approaches for the Determination of Stability Constants of Metal-Peptide Systems by Voltammetry*, *Anal. Biochem.*, 279 (2000) 189.
97. M. Esteban, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. S. Díaz-Cruz, R. Tauler, *Multivariate Curve Resolution with Alternating Least Squares Optimization: A Soft-Modelling Approach to Metal Complexation Studies by Voltammetric Techniques*, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 19 (2000) 49.

98. T. F. Brown, S. D. Brown, *Resolution of overlapped electrochemical peaks with the use of the Kalman filter*, *Anal. Chem.*, 53 (1981) 1410.
99. M. R. Smyth, J. G. Vos, *Analytical Voltammetry, Vol 27. Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier Science Ltd, Oxford (1992).
100. J. Heyrovský, *Elektrolýsa se rtuťovou kapkovou katódou*, *Chem. Listy*, 16 (1922) 256.
101. J. M. Pingaron, P. Sánchez, *Química electroanalítica: Fundamentos y aplicaciones*, Editorial Sintesis, Madrid (2003).
102. J. Wang, *Analytical electrochemistry*, John Wiley and sons, Hoboken 2004.
103. F. Winqvist, *Voltammetric electronic tongues - basic principles and applications*, *Microchim. Acta*, 163 (2008) 3.
104. J. Baker, *Analytical Chemistry by Open Learning, Mass Spectrometry*, John Wiley & Sons, Chichester (1999).
105. B. N. Pramanik, A. K. Ganguly, M. L. Gross, *Applied Electrospray Mass Spectrometry*, Marcel Dekker, Inc., New York (2002).
106. N. B. Cech, C. G. Enke, *Practical implications of some recent studies in electrospay ionization fundamentals*, *Mass Spectrom. Rev.*, 20 (2001) 362-387.
107. E. Freire, O. L. Mayorga, M. Straume, *Isothermal titration calorimetry*, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 950.
108. VP-ITC MicroCalorimeter User's Manual, MicroCal, LLC, www.microcalorimetry.com.
109. M. R. S. McCoustra, *Electronic Absorption Spectroscopy: Theory and Practice*, Springer-Verlag, Berlin (1990).
110. E. R. Malinowski, *Factor Analysis in Chemistry*, John Wiley and Sons, New York, 3rd ed. (2002).
111. 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 alpha- and beta-metallothionein Domains with Cadmium and Zinc, Environ. Sci. Technol., 37 (2003) 5609.

112. W. Windig, J. Guilment, *Interactive Self-Modeling Mixture Analysis*, Anal. Chem., 63 (1991) 1425.

113. O. Dracka, *Theory of current elimination in linear scan voltammetry*, J. Electroanal. Chem., 402 (1996) 19.

114. N. Serrano, K.Klosova, L. Trnkova, *Elimination Procedure as a Novel and Promising Mathematical Approach in Voltammetric Methods*, Electroanalysis, 22 (2010) 2071.

115. L. K. Limbach, R. Bereiter, E. Müller, R. Krebs, R. Gälli, W. J. Stark, *Removal of Oxide Nanoparticles in a Model Wastewater Treatment Plant: Influence of Agglomeration and Surfactants on Clearing Efficiency*, Environ. Sci. Technol., 42 (2008) 5828.

116. J. J. Lingane, *Thermodynamic Significance of Polarographic Half-Wave Potentials of Simple Metal Ions at the Dropping Mercury Electrode*, J. Am. Chem. Soc., 61 (1939) 2099.

117. R. M. Smith, A. E. Martell, *Critical Stability Constants: Other Organic Ligands*, vol. 3, p. 94, Plenum Press, New York, 1976.

118. E. Chekmeneva, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Complexation of Hg²⁺ with alpha-lipoic and dihydrolipoic acids: Study by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode and ESI-MS*, Electroanalysis, 22 (2010) 177.

119. E. Chekmeneva, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, M. *Binding of Hg²⁺ by Cys, Cys-Gly and reduced glutathione: Study by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode, electrospray ionization mass-spectrometry and isothermal titration calorimetry*, J. Electroanal. Chem., 644 (2010) 20.

120. E. Chekmeneva, J. M. Díaz-Cruz, C. Ariño, M. Esteban, *Study of the Hg²⁺ binding with chelation therapy agents by differential pulse voltammetry on rotating Au-disk electrode and electrospray ionization mass-spectrometry*, Anal. Chim. Acta, 653 (2009) 77.

121. S. Susarla, V. F. Medina, S. C. McCutcheon, *Phytoremediation: An ecological solution to organic chemical contamination*, *Ecol. Eng.*, 18 (2002) 647.
122. M. B. Kirkham, *Cadmium in plants on polluted soils: Effects of soil factors, hyperaccumulation, and amendments*, *Geoderma*, 137 (2006) 19.
123. L. Wei, J. R. Donat, G. Fones, B. A. Ahner, *Interactions between Cd, Cu, and Zn Influence Particulate Phytochelatin Concentrations in Marine Phytoplankton: Laboratory Results and Preliminary Field Data*, *Environ. Sci. Technol.*, 37 (2003) 3609.
124. R. Gusmão, C. Ariño, J. M. Díaz-Cruz, M. Esteban, *Electrochemical survey of the chain length influence in phytochelatin competitive binding by cadmium*, *Anal. Biochem.*, 406 (2010) 61.
125. A. M. Spuches, H. G. Kruszyna, A. M. Rich, D. E. Wilcox, *Thermodynamics of the As(III)–Thiol Interaction: Arsenite and Monomethylarsenite Complexes with Glutathione, Dihydrolipoic Acid, and Other Thiol Ligands*, *Inorg. Chem.*, 44 (2005) 2964.
126. A. Riul Jr., C. A. R. Dantas, C. M. Miyazakic, O. N. Oliveira Jr., *Recent advances in electronic tongues*, *Analyst*, 135 (2010) 2481–2495.
127. A. Mimendia, J. M. Gutiérrez, L. Leija, P. R. Hernández, L. Favari, R. Muñoz, M. del Valle, *A review of the use of the potentiometric electronic tongue in the monitoring of environmental systems*, *Environ. Modell. Softw.*, 25 (2010) 1023.
128. M. Peris, L. Escuder-Gilabert, *On-line monitoring of food fermentation processes using electronic noses and electronic tongues: A review*, *Anal. Chim. Acta*, 804 (2013) 29.
129. J. Olsson, F. Winqvist, I. Lundström, *A self-polishing electronic tongue*, *Sensor Actuat. B-Chem.* 118 (2006) 461–465.

Agradecimientos

Después de todos estos años de trabajo y aprendizaje, esta etapa ya ha llegado a su fin. Durante todo este tiempo, directa e indirectamente, han intervenido multitud de personas a las que quiero que quede reflejado mi agradecimiento. Por ello quiero dar las gracias:

Primero a mis dos directores, sin ellos todo este trabajo no hubiera sido posible. La Dra. Cristina Ariño y el Dr. José Manuel Díaz por su implicación, trabajo, conocimiento, consejos, colaboración y paciencia con mi redacción. Ambos me han hecho crecer a nivel científico y personal.

A continuación, al Ministerio de Ciencia e Innovación por mi beca FPI (BES-2010-032352), por la ayuda para mi estancia predoctoral (EEBB-I-13-06040) y por el apoyo económico a los proyectos de investigación en los que he intervenido (CTQ2009-09471 y CTQ2012-32863).

Uno de los principales responsables de haber llegado hasta aquí es el Dr. Miquel Esteban quien fuera mi tutor durante la licenciatura, a quien pedí información sobre las líneas de investigación cuando no sabía ni que máster quería hacer y el IP de mi beca a FPI. Por todo ello, junto a su gran ayuda y su siempre exquisita aportación científica a mi trabajo.

I owe special gratitude to the Prof. Anthony Turner from the University of Linköping for giving me the opportunity to work in his group and Prof. Fredrik Winquist for working in his laboratory. It was an unforgettable time in your laboratory, where I learned so much and I acquired this great and priceless experience. I am also thankful to Dr. Mats Eriksson who helped me during my stay in Linköping.

A todos mis compañeros presentes y pasados de Electroanálisis. A Rui y a Elena que me acogieron desde el primer día en el laboratorio, me iniciaron en la investigación, me ayudaron, guiaron y con quienes he compartido momentos inolvidables en el laboratorio. A Aris, simplemente agradecerle todo, ha sido un apoyo incondicional e imprescindible desde que lo conocí, el Rubicón está cruzado, así que sólo diré “alea jacta est”. A Olga con la que he compartido multitud de tardes, la mayoría en nuestro bar hipsteriano donde nos hemos reído del mundo y me ha apoyado siempre. A Núria por su inestimable ayuda y su contribución científica la cual ha llevado a que tengamos tres artículos. A Àngela que siempre me ha ofrecido su ayuda y me ha iniciado en el HPLC. A Inma por la infinidad de charlas y risas. A Velia por su apoyo y complicidad que hemos compartido estos 4 largos años.

A todos mis amigos, tanto los que conozco desde que iba al cole hasta los más recientes, no por ello menos importantes. Muy especialmente a Javi y a Melania quienes han estado aguantándome, apoyándome y he compartido tantos buenos momentos semana a semana durante todos estos años.

A María, desde que la conocí en el laboratorio ha estado a mi lado apoyándome en todo, presente cada día en mi vida y en mi corazón, incluso en la distancia que de momento nos separa. Si alguna vez dudo si todo esto mereció la pena, al mirarla sabré que sí.

Igual que he puesto en la dedicatoria de la Tesis, a toda mi familia por todo su amor, apoyo y confianza. Especialmente a mis padres y a mi hermana, qué puedo decir, son el cimiento de mi vida y han estado a mi lado respaldándome en todo y animándome para que siempre camine hacia adelante, esta Tesis es vuestra, GRACIAS.

