



Escola Tècnica Superior  
d'Enginyeria Agrària

Processos interfacials  
acobrats amb difusió:  
Modelització de fenòmens  
d'interès electroanalític,  
fisiològic i mediambiental.

Josep Monné Esquerda

Tesi Doctoral





**Universitat de Lleida**

Escola Tècnica Superior d'Enginyeria Agrària

**Processos interfacials  
acobrats amb difusió:  
Modelització de fenòmens  
d'interès electroanalític,  
fisiològic i mediambiental**

Memòria presentada per Josep Monné i Esquerda  
per optar al grau de Doctor per la Universitat de Lleida

Treball realitzat al Departament de Química de la Universitat de Lleida  
sota la direcció dels Drs. Josep Galceran i Nogués i Jaume Puy i Llorens



*A la meva família*



## *Agraïments*

*El meu agraïment més sincer a totes aquelles persones que m'han recolzat i ajudat en l'elaboració del present treball.*

Als codirectors de la tesi, Josep Galceran i Jaume Puy, per les seves sàvies indicacions, la seva dedicació constant i la seva infinita paciència i comprensió durant tot aquest temps.

Al Pepe, l'Encarna, el Joan, el Marià i el Francesc.

Al Ferran, la Paquita, el César, el Carlos, el Josep Lluís.

A l'Andrew.

A la Iolanda.

A totes les companyes i companys del Departament de Química

Als amics.

A tots el que m'heu fet confiança

*Pel vostre suport, moltes gràcies a tots!!!*





## Resum

La present Tesi se centra en l'estudi i modelatge de sistemes físico-químics de reacció-difusió en què una o més espècies es difonen vers una superfície sobre la qual es produeix una interacció amb alguna/algunes de les espècies que hi arriben. S'analitzen els fenòmens físico-químics implicats, es planteja la seva formulació matemàtica, s'aborda la resolució numèrica o analítica i s'estudien els comportaments del sistema i les respostes experimentals que es mesuren.

Com a casos particulars d'interès s'analitzen tres fenòmens: i) els corrents mesurats en les tècniques electroanalítiques afectades per adsorció electròdica; ii) el flux de bioassimilació d'ions metàl·lics o altres espècies químiques que arriben als microorganismes; i iii) els fluxos iònics a través de canals de gramicidina incorporats en una monocapa lipídica (amb o sense altres additius) que recobreix un elèctrode de mercuri.

La construcció de simuladors pels sistemes esmentats permet abordar el problema invers (la determinació de valors de constants físico-químiques implicades en aquests processos a partir de l'ajust a dades experimentals), la quantificació de la influència de l'adsorció del metall o del complex sobre els resultats de tècniques electroanalítiques, l'estimació de la bioacumulació en cultius controlats de microorganismes o l'efecte dels additius sobre la permeació dels canals iònics, aspecte fonamental per entendre l'acció de diferents fàrmacs o tòxics sobre les membranes biològiques.

Utilitzant un nombre reduït de paràmetres, la comparació dels resultats experimentals i de simulació pels tres casos resulta força acurada. L'obtenció dels perfils de concentració de totes les espècies implicades en les tècniques electroanalítiques ens permet i) entendre més profundament el procés, ii) concloure que l'adsorció té poc impacte en els corrents límit RPP i iii) proposar indicadors del grau d'assoliment de la hipòtesi d'excés de lligand. Pel que fa a la bioassimilació, i) es presenten expressions analítiques pels fluxos de bioassimilació en el cas d'adsorció lineal, i numèriques en adsorció langmuiriana; ii) es demostra que el règim transitori té influència en les quantitats acumulades durant la bioassimilació i iii) es dissenyen estratègies per obtenir els valors dels paràmetres del sistema fins i tot quan aquest són nombrosos. Pel que fa al transport d'ions a través de membranes lipídiques, la metodologia desenvolupada permet i) obtenir valors de la permeabilitat en sistemes de canals iònics a partir de corrents experimentals, i calcular els corrents previsibles; ii) reproduir els corrents observats experimentalment, i iii) analitzar l'impacte de diferents additius que poden interactuar o interferir amb la dinàmica dels canals de gramicidina amb un model que conté únicament quatre paràmetres.



## Resumen

Esta Tesis se centra en el estudio y modelización de sistemas físico-químicos de reacción-difusión en que una o más especies se difunden hacia una superficie sobre la cual se produce una interacción con alguna o algunas de las especies que llegan. Se analizan los fenómenos físico-químicos implicados, se plantea su formulación matemática, se aborda la resolución numérica o analítica y se estudian los comportamientos del sistema y las respuestas experimentales que se miden.

Como casos particulares de interés se analizan tres fenómenos: i) las corrientes medidas en las técnicas electroanalíticas afectadas por adsorción electròdica; ii) el flujo de bioasimilación de iones metálicos u otras especies químicas que llegan a los microorganismos; i iii) los flujos iónicos a través de canales de gramicidina incorporados sobre una monocapa lipídica (con o sin otros aditivos) que recubre un electrodo de mercurio.

La construcción de simuladores para los sistemas mencionados permite abordar el problema inverso (la determinación de valores de constantes físico-químicas implicadas en dichos procesos a partir de su ajuste a los datos experimentales), la cuantificación de la influencia de la adsorción de metal o de complejo sobre los resultados de las técnicas electroanalíticas, la estimación de la bioacumulación en cultivos controlados de microorganismos o el impacto de los aditivos sobre la permeación de los canales iónicos, aspecto fundamental para entender la acción de diferentes fármacos o tóxicos sobre las membranas biológicas.

Utilizando un número reducido de parámetros, la comparación de los resultados experimentales y de simulación en los tres casos resulta bastante satisfactoria. La obtención de los perfiles de concentración de todas las especies implicadas en las técnicas electroanalíticas nos permite i) entender el proceso más profundamente; ii) concluir que la adsorción tienen poco impacto en las corrientes límite RPP y iii) proponer indicadores del grado de cumplimiento de la hipótesis de exceso de ligando. Por lo que respecta a la bioasimilación, i) se presentan expresiones analíticas para los flujos de bioasimilación en el caso de adsorción lineal, y numéricas en adsorción langmuiriana; ii) se demuestra que el régimen transitorio influye en las cantidades acumuladas durante la bioasimilación; y iii) se diseñan estrategias para obtener los valores de los parámetros del sistema, aún cuando éstos son numerosos. Respecto al transporte de iones a través de membranas lipídicas, la metodología desarrollada permite i) obtener valores de la permeabilidad en sistemas de canales iónicos a partir de corrientes experimentales, y calcular las corrientes previsibles; ii) reproducir las corrientes observada experimentalmente y iii) analizar el impacto de diferentes aditivos que pueden interactuar o interferir con la dinámica de los canales de gramicidina, con un modelo que contiene únicamente cuatro parámetros.



## Summary

This work focuses on the study and modelling of some physicochemical reaction-diffusion systems in which one or more species diffuses towards a surface that interacts with one or several of the arriving species. The implied physicochemical processes are analyzed, their mathematical formulation is stated, the analytical or numerical resolution is tackled and the system behaviour and experimental responses are studied.

As some particular interesting systems, we analyze three phenomena: i) the measured currents in electroanalytical techniques affected by electrodic adsorption; ii) the biouptake flux of metallic ions or other chemical species reaching a microorganism; and iii) the ionic flux across gramicidin channels in a lipid monolayer (with or without other additives) covering a mercury electrode.

The building up of simulators for such systems allows to tackle the inverse problem (the determination, by fitting of the experimental data, of the value of the physicochemical constants implied in those processes), the quantification of the influence of metal or complex adsorption on the results of the electroanalytical techniques, the bioaccumulation estimation in controlled microorganisms cultures, or the additives' effects on ionic channels permeability, which is a key aspect to understand the action of drugs on the biological membranes.

Using a reduced set of parameters, experimental and simulated results for these three systems are in good agreement. Obtaining the concentration profiles of all the species involved in the electroanalytical techniques allows us i) to reach a deeper understanding of the process; ii) to conclude that adsorption has a low impact on the RPP limiting current, and iii) to suggest indicators of the fulfilment of ligand excess conditions. Concerning biouptake i) we present analytical expressions for uptake fluxes in linear adsorption, and numerical solutions for langmuirian adsorption; ii) we show that the transient regime influences the accumulated biouptake amounts and iii) some strategies are developed to obtain the system parameters values, even when they are numerous. Concerning ionic transport across lipid membranes, the developed methodology allows us i) to obtain the permeability values in ionic channels systems from experimental currents, and calculate the predicted currents ; ii) to reproduce the observed experimental currents, and iii) analyze the impact of several additives that can interact or interfere with the channels dynamics, with a four parameters model.



# ÍNDEX

Agraïments	vii
Resum	ix
Resumen	xi
Summary	xiii
Índex	xv

## PRÒLEG

1. Objectius	1
2. Estructura del present treball	2

## I. INTRODUCCIÓ

### CAPÍTOL 1. Introducció

1.1 Els sistemes estudiats	12
1.2 Els fenòmens físics considerats	13
1.2.1 El transport	14
1.2.2 L'adsorció	16
1.2.3 La complexació.	17
1.2.4 La internalització i/o la electroreducció.	18
1.2.5 Les condicions inicials i de contorn	18
1.3 Referències	19

### CAPÍTOL 2. Les tècniques electroanalítiques d'impulsos

2.1 Introducció	23
2.1.1 La Polarografia Normal d'Impulsos (NPP)	24
2.1.2 La Polarografia inversa d'impulsos (RPP)	26
2.2 L'efecte de la complexació sobre la funció resposta	27
2.3 Referències	30

### CAPÍTOL 3. La Bioassimilació i la Bioacumulació

3.1 Introducció	35
3.2 Visió general de la bioassimilació i l'acumulació	37
3.2.1 Processos implicats	37
3.2.2 Model de l'activitat del ió lliure (FIAM)	39
3.2.3 El model del lligand biotí (BLM)	43
3.3 Referències	45

### CAPÍTOL 4. Els canals iònics

4.1 Introducció	49
4.2 Canals iònics sobre monocapes lipídiques	51
4.2.1 Canals iònics de gramicidina	51
4.3 Marcs teòrics per analitzar la permeació	53
4.3.1 Model de la Dinàmica Molecular	53
4.3.2 Model del Continuum	54
4.3.3 Model de la Dinàmica Browniana	54
4.3.4 Model macroscòpic	54
4.4 Referències	57

<b>II. FORMALISME MATEMÀTIC</b>	<b>61</b>
<b>CAPÍTOL 5. Modelització de les tècniques electroanalítiques d'impulsos</b>	<b>63</b>
5.1	Descripció física del problema 65
5.2	Formulació matemàtica 66
5.2.1	El cas general 66
5.2.1.1	Formulació discreta del problema 70
5.2.2	El cas amb excés de lligand 79
5.3	Aplicació a les diferents tècniques electròdiques 82
5.3.1	Polarografia Normal d'impulsos (NPP) 82
5.3.1.1	Generació de l'ona NPP 82
5.3.1.2	Càlcul del corrent límit en NPP 84
5.3.2	Polarografia Inversa d'Impulsos (RPP) 85
5.3.2.1	Generació de l'ona RPP 86
5.3.2.2	Càlcul del corrent límit RPP 87
5.4	Referències 88
<b>CAPÍTOL 6. Modelització de la bioassimilació</b>	<b>89</b>
6.1	El cas d'una ruta metabòlica amb adsorció lineal. 91
6.1.1	Descripció física del sistema 91
6.1.2	Formulació matemàtica 92
6.1.2.1	Adsorció lineal 94
6.2	El cas de dues rutes metabòliques amb adsorció langmuiriana 100
6.2.1	Descripció física del sistema. 100
6.2.2	Formulació matemàtica 101
6.2.2.1	Estat estacionari 102
6.2.2.2	L'estat transitori 105
6.2.2.3	El límit d'adsorció lineal 108
6.3	Referències 109
<b>CAPÍTOL 7. Modelització dels canals iònics.</b>	<b>111</b>
7.1	Introducció 113
7.2	La funció de convolució. Semiintegració 114
7.3	Permeabilitat 115
7.4	Model per a la permeabilitat 118
7.5	Referències 122
<b>III. APLICACIÓ A SISTEMES EXPERIMENTALS</b>	<b>123</b>
<b>CAPÍTOL 8. Influència de l'adsorció en el corrent límit NPP i RPP en sistemes làbils metall-macromolècula</b>	<b>125</b>
8.1	Introducció 127
8.2	Model Físic 129
8.3	Corrents límit RPP i NPP per qualsevol relació de lligand a metall. 131
8.3.1	El cas sense adsorció 131
8.3.2	Cas amb adsorció 133
8.3.2.1	Només s'adsorbeix el complex 132
8.3.2.2	El lligand i el complex són adsorbits 138
8.4	Expressions analítiques aproximades pel corrent límit vàlides per qualsevol relació de lligand a metall. 143
8.4.1	Aproximació d'excés de lligand 146
8.4.2	Aproximació bulk 146
8.4.3	Aproximació ponderada 146
8.5	Aplicació als sistemes Zn-PMA i Cd-PMA 150



8.5.1	Reactius i instrumentació	150
8.5.2	Titulacions voltamètriques	151
8.5.3	Tractament de les dades	152
8.5.4	Resultats i discussió	152
8.6	Conclusions	155
8.7	Referències	156
<b>CAPÍTOL 9. Impacte del flux transitori d'assimilació en la bioacumulació. Adsorció lineal.</b>		<b>161</b>
9.1	Introducció	163
9.2	Modelització de la bioassimilació.	164
9.2.1	Formulació del model lineal	164
9.2.2	A concentracions baixes, l'adsorció seguida de l'internalització en qualsevol nombre de setis es pot descriure amb només dos paràmetres	167
9.3	Expressions pels fluxos i les quantitats acumulades	169
9.3.1	Solució analítica per l'estat estacionari	169
9.3.2	Solucions analítiques per la concentració a la superfície i el flux transitoris	170
9.3.3	Solucions analítiques per l'assimilació acumulada	173
9.4	Evolució del flux i de l'assimilació acumulada	173
9.4.1	L'impacte del radi	173
9.4.2	Descomponent el producte $k K_H$	175
9.4.3	Quan triga en assolir-se l'estat estacionari?	176
9.4.4	L'aproximació de l'estat estacionari instantani (ISSA, Instantaneous Steady State Approximation).	180
9.4.5	Aplicació a dades experimentals	183
9.5	Conclusions	186
9.6	Referències	186
<b>CAPÍTOL 10. Flux transitori de bioassimilació i acumulació. Adsorció langmuiriana</b>		<b>189</b>
10.1	Introducció	191
10.2	Formulació matemàtica del model.	194
10.3	El règim d'estat estacionari eventual	196
10.4	L'evolució dels fluxos i les quantitats acumulades en aproximar-se al règim estacionari	200
10.5	Quant triga en arribar l'estat estacionari?	204
10.6	Recuperant paràmetres de les dades de l'acumulació	206
10.6.1	Metodologia ISSA amb la càrrega total	206
10.6.2	Metodologia ISSA amb la fracció extreta corresponent a la quantitat adsorbida en un dels dos tipus de setis	218
10.6.3	Un refinament de la metodologia ISSA	211
10.7	Conclusions	217
10.8	Referències	219
<b>CAPÍTOL 11. Fluxos iònics en conjunts de canals en monocapes. Càlcul de la permeabilitat a partir dels corrents</b>		<b>221</b>
11.1	Introducció	223
11.2	Sistema experimental	224
11.3	Aproximació teòrica a la conducció	225
11.3.1	Formulació matemàtica per una permeabilitat genèrica $P(t)$	225
11.3.2	Model senzill per $P(t)$ basat en una interconversió de primer ordre dels canals iònics no conductors i conductors, acoblada amb una cinètica heterogènia de primer ordre pel pas pels canals	230
11.3.2.1	De la base física a l'expressió matemàtica	230
11.3.2.2	Impacte dels paràmetres en el model EDP	235
11.4	Anàlisi dels resultats experimentals	239
11.4.1	Validació del model EDP	239
11.4.1.1	Linealitat amb la concentració "bulk" de $Tl^+$	239
11.4.1.2	Bondat de l'ajust	240
11.4.2	Paràmetres obtinguts	241

11.5	Conclusions	244
11.6	Referències	245

**CAPÍTOL 12. Interpretació dels corrents deguts a fluxos d'ions a través de canals iònics sobre monocapes lipídiques.** **249**

12.1	Introducció	251
12.2	Sistema experimental	253
12.3	El Model de Decaiment Exponencial de la Permeabilitat amb una Etapa Reversible	256
12.3.1	Els principis bàsics	256
12.3.2	EDP sense pas reversible	257
12.3.3	EDP amb pas reversible o EDP refinat	259
12.4	Resultats i discussió	263
12.4.1	Impacte del potencial	263
12.4.2	Impacte del <i>all trans</i> retinol i del benzo- $\alpha$ -pirè afegits	270
12.4.2.1	Impacte en el corrent, en $P$ i en $P_{\infty}$	270
12.4.2.2	Impacte en $P_{\Delta}$	275
12.4.2.3	Impacte en $k_{\Sigma}$	277
12.4.2.4	Impacte en $k_3$	278
12.5	Conclusions	278
12.6	Referències	280

**IV. CONCLUSIONS** **283**

# Pròleg



## 1. Objectius

Aquesta Tesi se centra en el modelatge (l'anàlisi dels fenòmens químic-físics implicats, la seva formulació matemàtica, la resolució numèrica o analítica i l'estudi de les respostes) de problemes que pertanyen a àmbits d'aplicació i entorns diferents, però que tots tenen en comú, i com a element clau, la difusió vers una superfície en la qual es dona un procés de transformació de l'espècie activa. En particular, s'estudien: i) els processos d'adsorció que es donen en la superfície dels elèctrodes i la seva influència en les tècniques electroanalítiques; ii) els processos de bioassimilació d'ions metàl·lics o altres espècies químiques en els organismes, ja tinguin efectes nutritius o efectes tòxics, iii) processos en monocapes lípídiques sembrades de canals iònics (gramicidina amb o sense altres additius) sobre elèctrodes de mercuri que mimetitzen els fenòmens que tenen lloc en les membranes cel·lulars. Es pretén fer la construcció dels models a partir de la selecció i combinació adequada de processos físics o químics de descripció relativament senzilla, com ara el transport de l'espècie metàl·lica, l'adsorció de la mateixa sobre la superfície en qüestió, la complexació amb altres espècies del medi, la internalització a través de la membrana o el bescanvi electrònic en la superfície, usant un mínim nombre de paràmetres.

El modelatge permet, amb un cost relativament baix, estimar constants físico-químiques implicades en aquests processos, determinar rangs d'aplicabilitat de les hipòtesis i interpretar de manera poc costosa els fenòmens involucrats, com ara la influència de l'adsorció del metall o del complex sobre els resultats de tècniques electroanalítiques, l'efecte dels additius sobre la permeació dels canals iònics, o l'estimació de la bioacumulació en medis controlats.

## **2. Estructura del present treball**

Aquesta Tesi contempla l'estudi i modelització de tres sistemes físico-químics diferents.

Per cada un d'ells, s'organitza en tres parts diferenciades: la presentació del sistema estudiat, la descripció teòrica i la matemàtica en que es basa la seva modelització, i l'aplicació del model a sistemes experimentals. L'organització i estructura de la present Tesi es troba recollida en la taula 1.

Després d'un capítol introductori, a la primera part es fa una descripció dels sistemes estudiats, intentant remarcar-hi les similituds i diferències, assenyalar els fenòmens físics i químics considerats, i fent menció de la ubicació i la rellevància de cada sistema en els àmbits de coneixement i estudi corresponents.

En la segona part s'analitza la metodologia matemàtica emprada en la modelització de cada sistema concret, així com la justificació del seu ús en aquell àmbit. Per cada un d'ells, a partir de les matemàtiques que ens permeten representar els fenòmens físics considerats, s'ha desenvolupat un programa informàtic en llenguatge FORTRAN, que ens han permès simular numèricament el comportament d'aquests sistemes i obtenir valors de paràmetres rellevants dels mateixos. La seva aplicació posterior a sistemes experimentals reals ens han servit per contrastar la validesa dels models i per obtenir dades rellevants dels mateixos.

En la tercera part, es presenta l'aplicació d'aquests models a sistemes experimentals concrets, contrastant, amb els resultats obtinguts, la validesa i l'eficàcia del model que s'ha utilitzat en cada cas.

La primera part consta de quatre capítols:

- El capítol 1 pretén ser una introducció general del treball en la que es vol ressaltar, malgrat les diferències entre els diversos sistemes, aquells aspectes comuns que els donen unitat, els processos físics considerats i les seves característiques generals.

- El capítol 2 presenta els fenòmens associats als processos electròdics en electroanàlisi fent especial menció de les tècniques polarogràfiques d'impulsos.
- En el capítol 3 es fa referència als fenòmens associats amb la bioassimilació per part d'organismes aquàtics.
- En el quart capítol s'analitzen els fenòmens associats a les interaccions membrana medi en sistemes de canal iònics.

La segona part descriu el tractament matemàtic desenvolupat en cada cas per simular el comportament del sistema.

- En el capítol 5 s'explica l'aplicació del mètode dels elements finits a la simulació del processos electròdics en electroanàlisi.
- En el 6, es duu a terme el desenvolupament matemàtic per modelar la bioassimilació per part de microorganismes i s'apliquen solucions analítiques i aproximades fent servir el mètode de Huber, en funció del model d'adsorció considerat.
- En el 7, s'aplica la transformació de Laplace i el mètode de la semiintegració a la modelització dels corrents en canal iònics.

En la tercera part es presenten els resultats obtinguts en les modelitzacions quan s'han aplicat a l'estudi de sistemes experimentals reals o a alguns dels seus aspectes.

- En el capítol 8 es presenta el model considerat per analitzar la influència de l'adsorció en els corrents límits de les tècniques de NPP i RPP per sistemes làbils metall-macromolècula.
- En el capítol 9 s'utilitza el model corresponent per estudiar la bioassimilació i la bioacumulació per part de organismes aquàtics i analitzar la informació que es pot extreure del règim transitori, en contrast amb l'estacionari, a partir del flux de metall en el cas d'adsorció lineal del mateix sobre la superfície del

microorganisme. En el capítol 10 es considera el mateix sistema anterior amb adsorció langmuiriana.

- En el capítol 11 s'estudia i s'aplica el model al càlcul de la permeabilitat en sistemes de canals iònics sobre monocapes lipídiques a partir de la mesura experimental dels corrents mesurats amb tècniques voltamperomètriques. En el capítol 12 s'introdueixen refinaments al model anterior per tenir en compte l'efecte que determinats additius com el retinol o el benzopirè tenen sobre la permeabilitat de les membranes de canals iònics.

Cada capítol d'aquesta tercera part correspon, íntegrament o parcial, a una publicació en revistes científiques d'àmbit internacional. Les referències són:

Pel capítol 8:

*Influence of the adsorption phenomena on the NPP and RPP limiting currents for labile metal-macromolecule systems.*

Autors: J.Puy, M. Torrent, J.Monné, J.Cecília, J.Galceran, J.Salvador, J.L.Garcés, F.Mas, F.Berbel

**Journal of Electroanalytical Chemistry** 457 (1998) 229-246.

Pel capítol 9:

*The impact of the transient uptake flux on bioaccumulation. Linear adsorption and first-order internalisation coupled with spherical semi-infinite mass transport.*

Autors: J.Galceran, J.Monné, J.Puy, H.P. van Leeuwen

**Marine Chemistry** 85 (2004) 89-102.



Pel capítol 10:

*Transient biouptake flux and accumulation by microorganisms: The case of two type of sites with Langmuir adsorption.*

Autors: J.Galceran, J.Monné, J.Puy, H.P. van Leeuwen

**Marine Chemistry** 99 (2006) 162-176.

Pel capítol 11:

*Ion Fluxes to Channel Arrays in Monolayers. Computing the Variable Permeability from Currents.*

Autors: J.Monné, J.Galceran, J.Puy, A.Nelson

**Langmuir** 19 (2003) 4694-4700.

Pel capítol 12:

*Interpreting Ion Fluxes to Channel Arrays in Monolayers.*

Autors: J.Monné, Y.Díez, J.Puy, J.Galceran, A.Nelson

**Langmuir** 23(2007) 10581-10588.

Sistemes Modelitzats Apartats	Tècniques Voltamperomètriques d'impulsos	Bioassimilació i Acumulació	Sistemes de canals iònics sobre monocapes lipídiques
INTRODUCCIÓ			
PRESENTACIÓ DEL SISTEMES	CAPÍTOL 2	CAPÍTOL 3	CAPÍTOL 4
FORMALISME MATEMÀTIC	CAPÍTOL 5	CAPÍTOL 6	CAPÍTOL 7
APLICACIÓ A SISTEMES EXPERIMENTALS	<p style="text-align: center;">CAPÍTOL 8</p> <p>Influència de l'adsorció en els corrents límits NPP i RPP per sistemes làbils metall-macromolècula.</p>	<p style="text-align: center;">CAPÍTOL 9</p> <p>Impacte del flux transitori d'assimilació en la bioacumulació. Adsorció lineal i internalització de primer ordre acoblada amb transport massic esfèric i semi-infinit.</p> <p style="text-align: center;">CAPÍTOL 10</p> <p>Flux transitori de bioassimilació i acumulació. El cas de dos tipus de setis amb adsorció langmuiriana.</p>	<p style="text-align: center;">CAPÍTOL 11</p> <p>Fluxos iònics cap a arranjaments de canals en monocapes. Càlcul de la permeabilitat variable a partir dels corrents.</p> <p style="text-align: center;">CAPÍTOL 12</p> <p>Interpretació dels fluxos iònics cap a arranjaments de canals en monocapes.</p>
CONCLUSIONS			

**Taula 1.** Organització i estructura de la Tesi

# I. Introducció



# Introducció



## 1. Introducció

Una gran quantitat de processos químics, fisico-químics, fisiològics, o mediambientals impliquen l'existència de superfícies de separació entre dos medis diferents en les que es donen una varietat de fenòmens relacionats amb els materials que hi arriben, les travessen o s'hi transformen. Un bon nombre de reaccions químiques acostumen a tenir lloc sobre una interfície on els reactius poden adsorbir-se i es facilita el contacte entre ells (1); la toxicitat directa dels metalls sobre els éssers vius depèn de la seva capacitat per travessar membranes biològiques(2,3); les membranes cel·lulars són travessades per ions o molècules petites, nutrients o no, a través de canals en les mateixes formant part dels processos de la bioassimilació i la bioacumulació (3); els ions metàl·lics travessen els canals iònics i són responsables dels mecanismes de transmissió d'estímuls elèctrics a través de les neurones (4); els cations metàl·lics es redueixen sobre la superfície d'un elèctrode de mercuri per aplicació d'un potencial elèctric. Aquests, i molts altres, són exemples de situacions en les que una interfície de separació participa activament en fenòmens físics, químics o fisico-químics d'importància acoblats a un procés de difusió. El seu coneixement i la seva descripció acurada faciliten la interpretació dels processos i la planificació i optimització de dissenys experimentals relacionats amb els mateixos. La modelització i simulació matemàtica d'aquests processos permeten conèixer amb més detall el funcionament dels mateixos per comparació del resultats obtinguts en la simulació amb els resultats experimentals reals i, d'aquí, anar progressant amb el refinament dels models.

En totes aquestes situacions, a més de la difusió pura, apareixen fenòmens físics determinants del resultat global del procés. En són exemples la interacció química amb altres elements del medi (complexació) molt freqüent en medis naturals, l'adsorció sobre la superfície, la internalització en l'altre medi sense canvi d'estat d'oxidació (per

exemple en la bioassimilació) o amb canvi d'estat (per exemple, en processos de transferència electrònica heterogènia), etc...

L'estudi d'aquestes fenòmens i la seva correcta descripció matemàtica resulten claus per a poder interpretar el procés considerat des d'una perspectiva global i comparar els seus resultats i previsions amb els resultats reals dels sistemes experimentals "modelitzats" i avançar en el refinament dels models.

## 1.1 Els sistemes estudiats

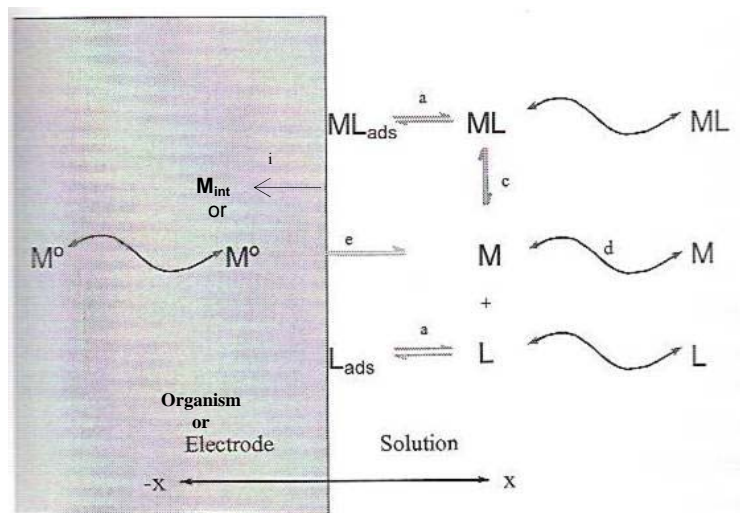
En aquest treball hem desenvolupat diferents mètodes amb la finalitat de modelar:

- i) els senyals obtinguts en les tècniques voltamperomètriques de la polarografia normal d'impulsos (NPP) i polarografia inversa d'impulsos (RPP) amb l'objectiu d'analitzar els efectes de l'adsorció en els corrents límits d'aquestes tècniques,
- ii) la bioassimilació, beneficiosa o perjudicial, de metalls per part de microorganismes aquàtics, considerant adsorció lineal o langmuiriana sobre la seva superfície i amb l'objectiu de determinar a partir de les dades de bioacumulació els valors dels paràmetres fisico-químics involucrats, i
- iii) l'electroreducció d'un metall sobre un elèctrode de gota de mercuri recobert d'una membrana de fosfolípids en la que s'ha fet una "sembra" de gramicidina, per tal de reproduir-ne els corrents mesurats i determinar una forma específica per la cinètica de la permeació dels canals iònics.



## 1.2 Els fenòmens físics considerats

En el marc dels sistemes estudiats en la present tesi, es consideren una sèrie de fenòmens físics, la descripció matemàtica dels quals resulta fonamental per la modelització adequada del sistema. Alguns, com el transport difusiu, són comuns a tots els sistemes sota estudi. Altres apareixen i són considerats només en funció del nivell de complexitat sota el que es vulgui considerar el sistema (complexació o l'adsorció de l'espècie metàl·lica sobre la interfície de separació entre el medi i el sistema) i de la tipologia del fenomen específic considerat (procés redox, internalització a través d'un porus o d'un canal iònic, o assimilació d'un metall traça cap a l'interior d'un organisme). En el cas més general, el conjunt de processos que poden considerar-se és el reflectit en l'esquema de la figura 1.1.



**Figura 1.1:** Representació esquemàtica dels diferents processos considerats en el present treball.

Considerant la retolació de les fletxes de la figura 1.1, en primer lloc, l'espècie activa ha de desplaçar-se des del si de la solució cap a la interfície de separació entre el medi i l'organisme, la cèl·lula o l'elèctrode (fletxes d). Aquesta es considera sempre com una superfície homogènia de contorns ben definits(5,6). En el camí, i en funció de les

condicions del medi, pot trobar-se amb altres espècies o lligands que poden manifestar una certa afinitat pel metall i complexar-se amb ell (fletxes c). El transport de metall pot fer-se aleshores en forma de metall lliure o de complex metàl·lic, pel qual considerem un coeficient de difusió similar al del lligand ( $D_L = D_{ML}$ ). Sobre la superfície de separació, el metall i el complex poden adsorbir-se (fletxes a) en uns llocs específics seguint una isoterma que pot considerar-se lineal o langmuiriana. El complex es considera làbil, això és, l'equilibri de complexació és prou ràpid al llarg de la capa de difusió. En darrer terme, se segueix o bé un procés de reducció (fletxa e) del catió metàl·lic, pel qual es considera un procés redox d'equilibri, o bé un procés d'internalització (fletxa i) cap a l'interior de l'organisme, pel que es considera una cinètica heterogènia de primer ordre, és a dir, el flux d'internalització és proporcional a la concentració de l'espècie activa sobre la superfície.

Veiem amb més detall les expressions fonamentals que s'han tingut en compte per cada un d'aquests fenòmens.

### 1.2.1 El transport

En el cas més general, l'equació de Nernst-Plank (7)

$$J_i = \underbrace{-D_i \text{grad } c_i}_{\text{terme difusiu}} - \underbrace{\frac{z_i}{|z_i|} c_i u_i \text{grad } \psi}_{\text{terme conductiu}} + \underbrace{c_i v}_{\text{terme convectiu}} \quad (1.1)$$

descriu el flux de l'espècie  $i$  com la suma de tres contribucions. Una és deguda a un gradient de concentració,  $c_i$ , i dóna lloc a la difusió, amb coeficient  $D_i$ . La segona es deu a un gradient de potencial elèctric,  $\psi$  i correspon al procés de conducció de l'espècie carregada amb càrrega  $z_i$  i mobilitat  $u_i$ . La tercera correspon a un terme convectiu que presenta una velocitat de la solució  $v$  en el punt on el flux es mesurat.

En absència de camps elèctrics i en solucions no agitadaes, l'equació anterior es resumeix en la coneguda primera llei de Fick:

$$J_i = -D_i \text{grad } c_i \quad (1.2)$$

Aquestes dues condicions s'han considerat sempre en els sistemes estudiats. En tots els sistemes s'ha considerat que els termes convectiu i migratori són negligibles per absència d'agitació i per la presència d'un electròlit de suport en si de la solució. Així, el transport en la mateixa es considera exclusivament difusiu.

L'aplicació de l'equació (1.2) a la superfície de l'elèctrode ens permetrà determinar el corrent faradàic:

$$I_i = n_i F A J_i \quad (1.3)$$

on  $n_i$  correspon al nombre d'electrons implicats en el procés redox de l'espècie  $i$ ,  $F$  és el Faraday,  $A$  la superfície de l'elèctrode, i  $J_i$  el flux d'aquesta espècie.

La segona llei de Fick

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D_i \nabla^2 c_i \quad (1.4)$$

ens dóna la variació de la concentració de l'espècie  $i$  amb el temps en un punt qualsevol de la solució i es deriva de la condició de conservació de la massa de l'espècie  $i$  en un cert punt de la solució quan no hi ha termes cinètics.

Les equacions (1.2) i (1.4) estan formulades en termes generals, però adopten expressions concretes en funció de la geometria del sistema.

En els sistemes en què s'apliquen polsos de potencials (elèctrode de gota de mercuri usat en NPP i RPP, i HMDE recobert de lípids en el sistema de canals iònics) la curta durada del pols permet considerar un molt curt abast espacial del fenomen i que la difusió és plana. Amb aquesta hipòtesi, l'equació (1.2) pot escriure's com

$$J_i(x,t) = -D_i \frac{\partial c_i(x,t)}{\partial x} \quad (1.5)$$

i la (1.4) com

$$\frac{\partial c_i(x,t)}{\partial t} = D_i \frac{\partial^2 c_i(x,t)}{\partial x^2}. \quad (1.6)$$

En el cas dels sistemes corresponents a la bioassimilació, on no hi ha polsos de potencial involucrats, la forma dels microorganismes s'ha considerat esfèrica, amb difusió segons la dimensió radial. La consideració d'aquesta geometria fa que les equacions (1.2) i (1.4) s'escriuin com(8)

$$J_i = -D_i \frac{\partial c_i(r,t)}{\partial r}, \quad (1.7)$$

i

$$\frac{\partial c_i(r,t)}{\partial t} = D_i \left( \frac{\partial^2 c_i(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_i(r,t)}{\partial r} \right). \quad (1.8)$$

### 1.2.2 L'adsorció

En els sistemes en els que es considera aquest procés (tècniques electròdiques i bioassimilació) la isoterma general que es fa servir és la isoterma de Langmuir. Aquesta considera un equilibri entre la fracció de llocs ocupats i desocupats en la superfície corresponent. Formalment, l'expressió matemàtica que descriu la isoterma considerada és:

$$\Gamma_i(t) = \Gamma_{\max,i} \frac{k_i c_i(0,t)}{1 + \sum_j k_j c_j(0,t)} \quad (1.9)$$

on  $\Gamma_i$  representa la concentració superficial de l'espècie adsorbida  $i$  (real o formal),  $\Gamma_{\max,i}$  el valor màxim o de saturació de la mateixa,  $k_i$  la constant d'adsorció d'aquesta espècie en la superfície,  $c_i$  la seva concentració volúmica i la suma s'estén a totes les espècies  $j$  susceptibles d'adsorció. Molt sovint s'utilitza un formalisme similar al de Michaelis-Menten per l'expressió anterior. Aleshores (1.9) s'escriu com:

$$\Gamma_i(t) = \Gamma_{\max,i} \frac{c_i(0,t)}{K_{M,i} + c_i(0,t) + \sum_{j \neq i} K'_{M,j} c_j(0,t)}, \quad (1.10)$$

on  $K_{M,i} = \frac{1}{k_i}$  (M en el subíndex per Michaelis) i  $K'_{M,j} = \frac{k_j}{k_i}$ .

La isoterma lineal o de Henry es considera també, perquè en aquest cas el formalisme matemàtic és més senzill i les equacions admeten solució analítica(9), cosa que permet comprovar la bondat de les simulacions, ja que aquesta situació és a la que es tendeix en el límit de recobriments baixos. En aquestes circumstàncies, l'expressió de la isoterma corresponent pot posar-se com:

$$\Gamma_i(t) = K_H c_i(0,t), \quad (1.11)$$

on  $K_H$  es refereix a la constant d'adsorció lineal o de Henry.

### 1.2.3 La complexació.

Per la complexació, en aquells sistemes estudiats en els que s'ha tingut en compte (anàlisi voltamperomètrica d'impulsos), hem considerat només l'existència d'una espècie complex formal, ML, la concentració de la qual,  $c_{ML}(x,t)$ , correspon a la de la totalitat de llocs ocupats per l'espècie metàl·lica M sobre el lligand L, que disposa d'una concentració total de llocs lliures i susceptibles de complexació,  $c_L(x,t)$  (10). Similarment, es poden definir altres espècies formals de concentració fàcilment relacionable amb les anteriors, com la concentració total de metall  $c_{T,M}(x,t) = c_{ML}(x,t) + c_M(x,t)$ , o la concentració total de lligand,  $c_{T,L}(x,t) = c_{ML}(x,t) + c_L(x,t)$ . Per aquestes espècies formals, la condició de labilitat estableix que en tot lloc i moment s'arriba a l'equilibri:

$$K = \frac{c_{ML}(x,t)}{c_M(x,t) \cdot c_L(x,t)}. \quad (1.12)$$

Si considerem que tots els llocs són equivalents i independents, aquesta constant és igual a la de les constants d'estabilitat intrínseques de complexació de cada lloc particular(10).

#### 1.2.4 La internalització i/o la electroreducció.

El destí final de l'espècie metàl·lica dipositada sobre la superfície en els sistemes considerats passa per la reducció nernstiana del catió  $M^{n+}$  per formar  $M^0$  que s'amalgama amb el mercuri de l'elèctrode (primer sistema), o internalitzar-se a l'interior de l'organisme (sistema de la bioassimilació) o les dues coses successivament: translocació a través dels canals i posterior reducció en el mercuri (canals iònics).

La internalització es considera que es tracta d'un procés cinètic heterogeni de primer ordre, és a dir, el flux d'internalització és proporcional a la concentració de metall adsorbit, (quan es considera adsorció) a la superfície de l'organisme o a la concentració de canals oberts o actius presents en el sistema (en el sistema de membrana lipídica).

El procés de reducció es considera subjecte a la condició de reversibilitat electroquímica (Nernst),

$$c_M(0, t) = c_{M^0}(0, t) e^{\frac{nF}{RT}(E(t) - E_0)}, \quad (1.13)$$

on els subíndexs  $M$  i  $M^0$  fan referència a les espècies oxidada i reduïda del metall, respectivament,  $E$  i  $E_0$  el potencial aplicat i el potencial normal de reducció de l'espècie corresponent,  $n$  el nombre d'electrons posats en joc,  $F$  el valor de la constant de Faraday,  $R$ , la constant dels gasos i  $T$  la temperatura absoluta del sistema.

#### 1.2.5 Les condicions inicials i de contorn

A part de les equacions diferencials que es plantegen a partir dels fenòmens anteriors, normalment cal introduir condicions que completen les solucions particulars dels

sistemes. Aquestes acostumen a donar-se en forma de condicions inicials i de condicions frontera o de contorn.

Les condicions inicials tingudes en compte en els sistemes estudiats en aquest treball són:

a) si no hi ha procés redox,

$$c_i(x, 0) = c_i^*, \quad \forall x \quad (1.14)$$

b) si hi ha reducció cal afegir a la condició anterior

$$c_{i,0}(x, 0) = 0, \quad \forall x. \quad (1.15)$$

$c_i^*$  i  $c_{i,0}$  fan referència, respectivament, a la concentració de l'espècie  $i$  al si ("bulk") de la solució i a la concentració de la forma reduïda de l'espècie  $i$ .

Pel que fa a les condicions de contorn, aquestes corresponen a la difusió lineal o esfèrica semi-infinita, que s'expressen com:

$$\left. \begin{array}{l} \lim_{x \rightarrow \infty} c_i(x, t) = c_i^* \\ \lim_{x \rightarrow \infty} c_{i,0}(x, t) = 0 \end{array} \right\} \quad \forall t, \quad (1.16)$$

i a les condicions sobre la superfície segons el sistema considerat: adsorció, (1.9) o (1.11) i la de l'equilibri redox, (1.13).

### 1.3 Referències

1. Bockris, J. O.; Reddy, A. K. M. *Modern Electrochemistry. Ionics*, 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 2002.
2. Cassassas, E. In *Modelització macroscòpica en Ciències Experimentals*; Cassassas, Esteban, M., Eds.; Institut d'Estudis Catalans: Barcelona, 1996; pp 15-38.
3. Tessier, A.; Turner, D. R. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, John Wiley & Sons: Chichester. UK, 1995.
4. Hille, B. Sinauer. (Ed.) *Ionic channels of excitable membranes*, Second ed.; Sunderland, MA, 2001.

- 
5. Leermakers, F. A. M.; Kleijn, J. M. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester (UK), 2004; pp 15-111.
  6. Hanai, T.; Haydon, D. A. The permeability to water of bimolecular lipid membranes. *J.Theor.Biol.* **1966**, *11*, 370-382.
  7. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 1980.
  8. Britz, D. *Digital Simulation in Electrochemistry*, 2nd. ed.; Springer: Berlin, 1988.
  9. Galceran, J.; van Leeuwen, H. P. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester (UK), 2004; pp 147-203.
  10. Galceran, J. Electroanàlisi de complexos làbils metall-ligand amb adsorció induïda. Ph.D. Thesis. UB, 1994.



# Capítol 2

Les Tècniques Electroanalítiques

d'Impulsos



## 2. Les tècniques electroanalítiques d'impulsos

### 2.1 Introducció

Les tècniques polarogràfiques d'impulsos consisteixen en l'enregistrament del corrent obtingut com a resposta a l'aplicació d'un programa de potencials en esglao (és a dir, impulsos de potencial) a un elèctrode de gota de mercuri.

La cel·la acostuma a constar de dos o tres elèctrodes (figura 2.1) submergits en una dissolució que conté l'anàlit i també un excés d'un electròlit no reactiu que s'anomena electròlit suport. Un dels elèctrodes és l'elèctrode de treball, de gotes de mercuri, el potencial del qual va variant en funció del programa de polsos aplicat en la tècnica corresponent. El segon elèctrode és un elèctrode de referència (normalment de calomelans saturat o de plata/clorur de plata) el potencial del qual es manté constant durant l'experiment. El tercer elèctrode, si n'hi ha, és l'elèctrode auxiliar, que condueix el corrent des de la font de senyal, a través de la dissolució cap a l'elèctrode. La font de senyal és un generador de polsos de potencial i el senyal de sortida, la intensitat de corrent resultant s'enregistra en funció del temps.

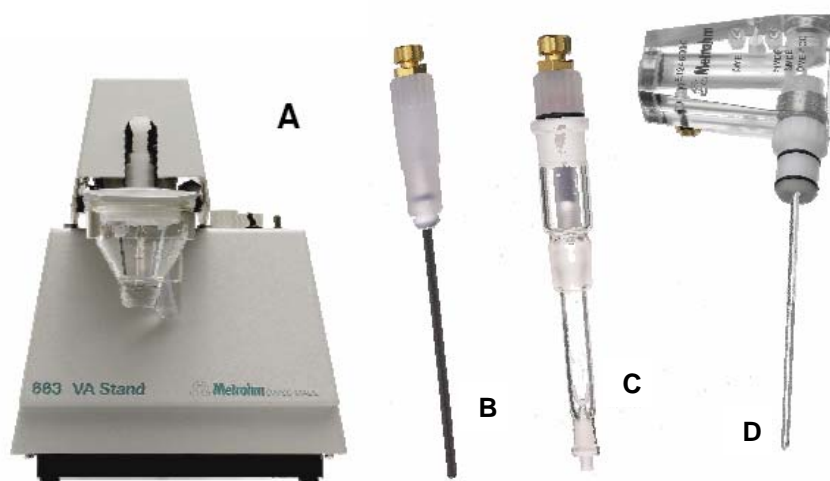


Figura 2.1: Material i elèctrodes utilitzats habitualment en polarografia. A) Stand polarogràfic 663 VA amb cel·la voltamperomètrica, B) Elèctrode auxiliar de carboni vitrificat, C) Elèctrode de referència Ag/AgCl (KCl 3M), D) Elèctrode multimode de mercuri (SMDE i HMDE).

La gota, considerada de mida constant, es forma en un temps negligible comparat amb el temps de vida de la mateixa ( $t$ ). La concentració del metall electroactiu en la dissolució pot considerar-se pràcticament constant d'una gota a una altra (2).

El potencial aplicat segueix una programa lleugerament diferent segons la tècnica impulsional que es treballa.

### 2.1.1 La Polarografia Normal d'Impulsos (NPP)

Així, en la **NPP** (Polarografia Normal d'Impulsos, Normal Pulse Polarography), (Fig.2.2) la vida de cada gota es troba seccionada en dues etapes corresponents als dos esglaons de potencial aplicats. En el primer, s'aplica un potencial base  $E_b$ , prou positiu com per a no implicar reducció del metall, i comú a totes les gotes, durant un temps  $t_0$ . En aquest instant s'aplica sobtadament un potencial  $E_i$  ( el subíndex  $i$  fa referència a la gota en la seqüència corresponent, i per tant, al potencial que li correspon) diferent en cada gota fins al temps  $t_d$ , temps de vida de la gota, i que és constant i comú per a totes elles. El valor de  $E_i$ , en aquesta tècnica és cada cop més negatiu (més reductor) i es decrementa de manera constant d'una gota a la següent. La representació de la mesura del corrent a  $t_d$  davant del potencial aplicat en l'etapa reductora de cada gota ens dóna l'ona NPP (Fig. 2.3 ).

De les ones NPP se'n treuen, bàsicament, dues dades rellevants. La primera és el valor del corrent límit,  $I_{lim}$ , corrent que s'obté quan ja no hi ha variació en el mateix encara que el potencial es faci més i més reductor. Correspon al límit de difusió, és a dir, a la situació que es dóna quan el potencial és molt reductor i la concentració de l'espècie electroactiva cau a zero en la superfície de l'elèctrode. El corrent és regulat per l'aportació de metall per difusió des del si de la dissolució.

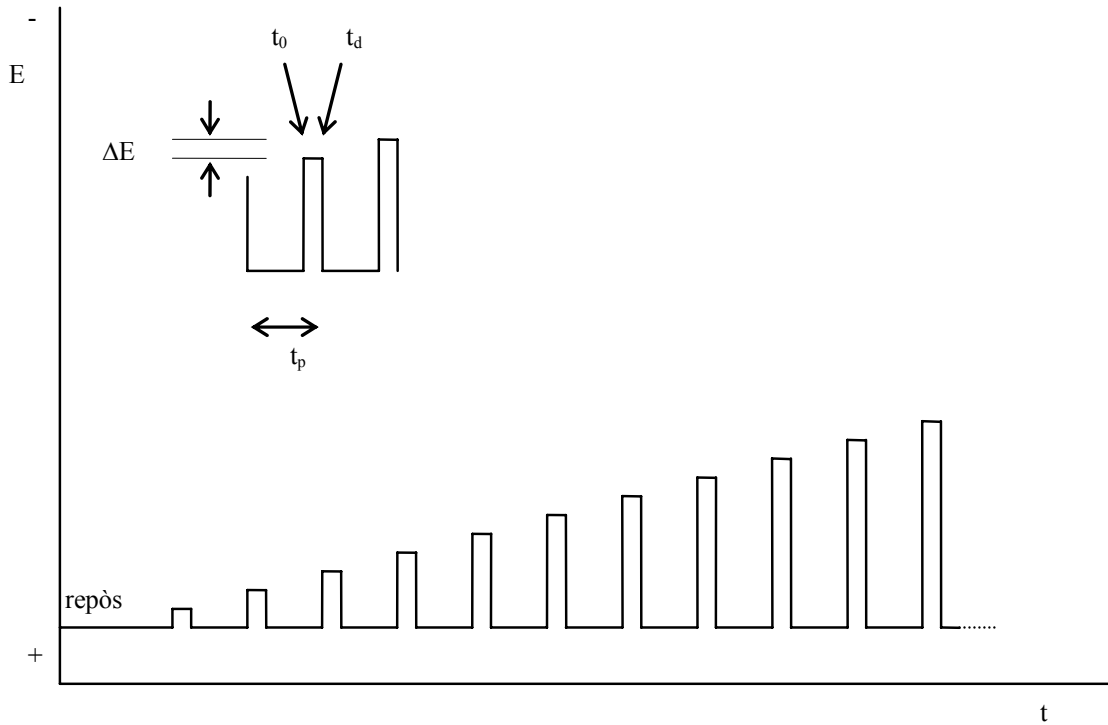


Figura 2.2: Esquema del programa de potencials aplicat en la tècnica NPP.

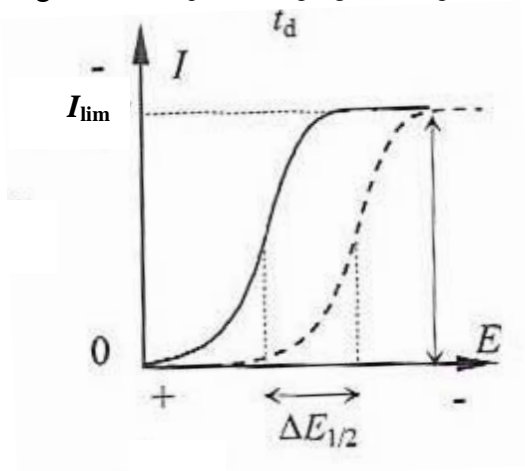


Figura 2.3 : Ona NPP. La línia contínua correspon al cas amb excés de lligand làbil i amb  $D_M=D_{ML}$  i la discontinua a l'ona quan no hi ha lligand. S'indica el desplaçament del potencial de semionda i els valors corresponents als corrents límit. De (3)

L'altra dada correspon al potencial de semionda,  $E_{1/2}$ , potencial en el qual el corrent val la meitat del corrent límit.

### 2.1.2 La Polarografia inversa d'impulsos (RPP)

En la tècnica **RPP** (Polarografia inversa d'impulsos, Reverse Pulse Polarography) (Fig. 2.4) s'aplica un potencial base, comú a totes les gotes, molt reductor en el primer esgló de manera que s'assoleixi el límit de difusió. El potencial del segon esgló va variant de gota en gota i escombra des de potencials molt reductors a potencials molt oxidants, de manera que es reoxidarà part del producte generat en la primera etapa de la gota i apareixerà un corrent de signe contrari al de reducció de l'espècie electroactiva. La gràfica del corrent a  $t_d$  en front del potencial de la segona etapa serà ara com el de la figura 2.5, on s'ha considerat positiu el corrent de reducció.

Es defineix el corrent límit RPP,  $I_{RPP,lim}$ , com la diferència dels corrents corresponents a potencials molt reductors (zona plana superior) i a potencials molt oxidants. Ambdós corrents estan limitats pel transport del metall i del producte, respectivament. El potencial de semionia es defineix de manera anàloga a com s'havia fet en el cas NPP.

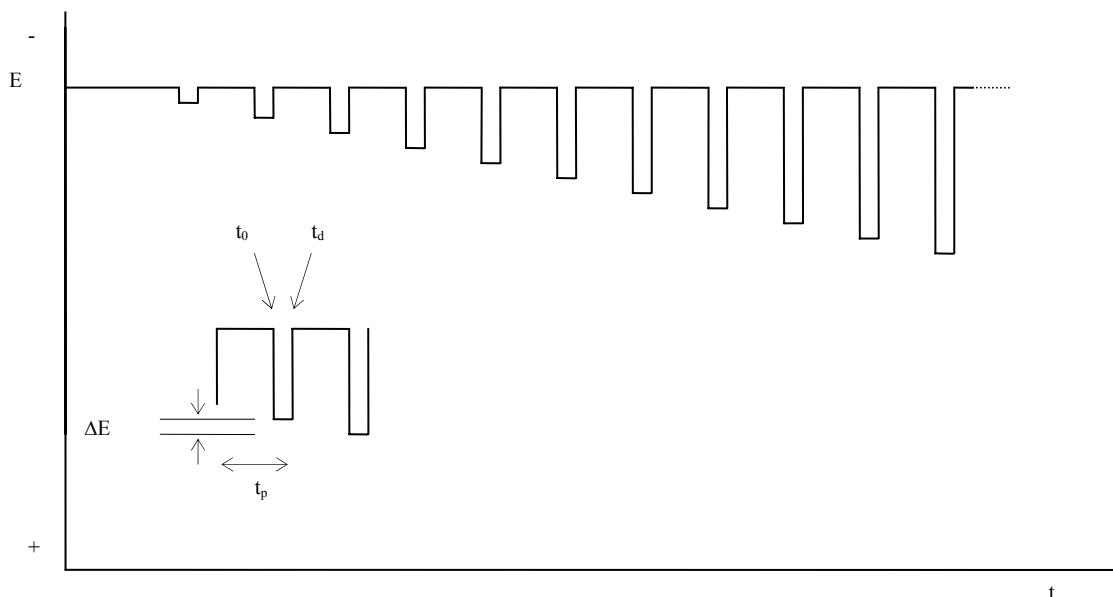


Figura 2.4 : Esquema del programa de potencials aplicats en la tècnica RPP.

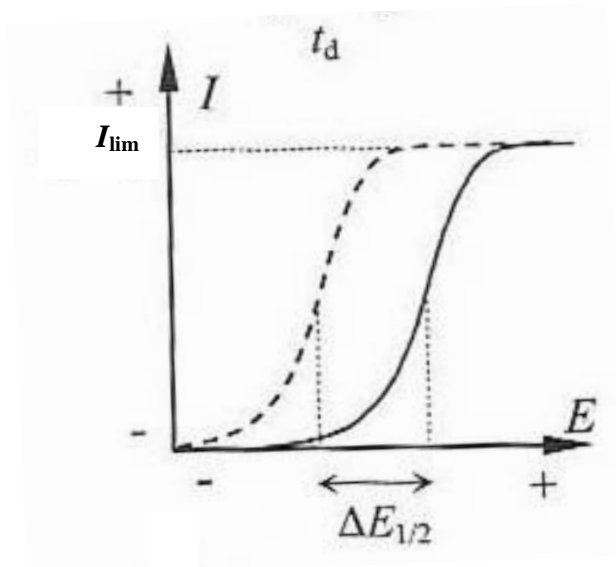


Figura 2.5 : Ona RPP. La línia contínua correspon al cas amb excés de lligand i la discontinua a l'ona quan no hi ha excés de lligand que forma un complex làbil amb M i  $D_M = D_{ML}$ . De (3)

## 2.2 L'efecte de la complexació sobre la funció resposta

Com s'aprecia en les figures 2.3 i 2.5 la presència d'un complex en la dissolució fa que el potencial de semireducció per a la reducció sigui, en general, més negatiu que el corresponent a la reducció del ió metàl·lic quan aquest està sol. La taula 2.1 mostra aquest efecte(4). De fet, aquest desplaçament negatiu en el potencial permet esbrinar l'estequiometria del complex i determinar la seva constant de formació si es compleixen un seguit de condicions. La relació de Lingane (2.1) (5) inclou condicions com elèctrode pla, difusió semi-infinita, reacció electròdica reversible, reacció de complexació totalment làbil, excés de lligand i prescriu

$$(E_{1/2})_c - E_{1/2} = -\frac{0,0592}{n} \log K_f - \frac{0.0592x}{n} \log c_L \quad (2.1)$$

on  $(E_{1/2})_c$  i  $E_{1/2}$  són els potencials de semireducció pels cations complexats i no complexats respectivament,  $K_f$  és la constant de formació del complex,  $n$  és el nombre d'electrons bescanviats i  $x$  és la relació estequiomètrica entre el lligand i el metall, fa possible avaluar la fórmula del complex. Mitjançant una representació del potencial de semireducció

en front de  $\log c_L$ , per diverses concentracions de lligand s'obté una línia recta de pendent  $-0,0592x/n$ . Si el valor de  $n$  es conegut, la relació  $x$  es calcula fàcilment, i a partir de l'equació anterior pot determinar-se  $K_f$ .

Ió	Medis no complexants	1M KCN	1M KCl	1M NH <sub>3</sub> , 1M NH <sub>4</sub> Cl
Cd <sup>2+</sup>	-0.59	-1.18	-0.64	-0.81
Zn <sup>2+</sup>	-1.00	NR	-1.00	-1.35
Pb <sup>2+</sup>	-0.40	-0.72	-0.44	-0.67
Ni <sup>2+</sup>	---	-1.36	-1.20	-1.10
Co <sup>2+</sup>	---	-1.45	-1.20	-1.29
Cu <sup>2+</sup>	+0.02	NR	+0.04 -0.22	-0.24 -0.51

Taula 2.1: Efecte del complex sobre el potencial de semion polarogràfic en l'elèctrode de gota de mercuri. (NR: no hi ha reducció abans de la de l'electròlit suport) (de (4))

La funció resposta, el corrent mesurat, suposant que és generat exclusivament per la reducció del ió metàl·lic per a formar el metall reduït, i suposant que aquest no s'acumula sobre la superfície de l'elèctrode, sinó que es difon vers l'interior de l'amalgama, pot escriure's com (1):

$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot J_{M^0}(0, t) \quad (2.2)$$

essent  $F$  el Faraday,  $A$  l'àrea de l'elèctrode, i  $J_{M^0}$  el flux de l'espècie metàl·lica formada.

Com s'ha descrit en l'apartat 1.2.1 del capítol 1, l'equació de Nernst-Planck preveu, pel cas monodimensional, que el flux de qualsevol espècie pot escriure's com:

$$J_i(x, t) = -D_i \frac{\partial c_i(x, t)}{\partial x} - \frac{n_i F}{RT} D_i \cdot c_i \frac{\partial \phi(x, t)}{\partial x} + c_i \cdot v(x, t) \quad (2.3)$$

on els tres termes del segon membre de l'equació fan referència a les contribucions al flux de la difusió, la migració i la convecció de l'espècie indicada, respectivament.

Si negligim els efectes de la migració i la convecció, la combinació de les expressions (2.2) i (2.3) permet escriure (2)

$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot D_{M^0} \cdot \left( \frac{\partial c_{M^0}(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (2.4)$$



La mesura del decreixement del corrent límit amb l'augment de la concentració total de lligand és un mètode que s'ha vingut usant habitualment en l'anàlisi voltamperomètrica de sistemes metall – macromolècula, per avaluar les constants d'estabilitat dels complexos metàl·lics làbils en condicions d'excés de lligand(6,7).

Una manera de representar la funció resposta en el cas en el que hi ha complexació és utilitzar el corrent límit normalitzat (8),  $\phi$ , definit com la relació entre el corrent límit a una determinada concentració total de lligand i el corrent límit, sense complexació:

$$\phi = \frac{I_{\text{lim}}(\text{amb lligand})}{I_{\text{lim}}(\text{sense lligand})} \quad (2.5)$$

En la gràfica 2.6 pot observar-se la variació de  $\phi$  amb  $c_{T,L}^*$  en NPP

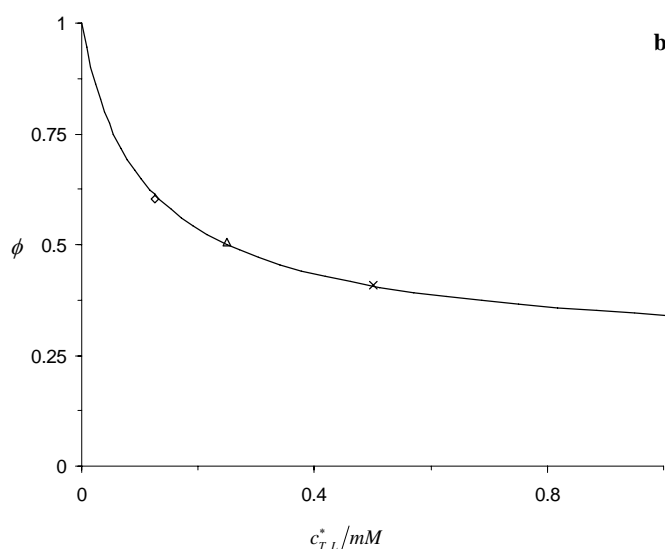


Figura 2.6 : Variació del corrent límit normalitzat,  $\phi$ , amb la concentració total de lligand en el si de la solució.

Un inconvenient que sovint invalida o desvirtua parcialment els resultats experimentals i en dificulta la seva interpretació es dona quan es produeix adsorció del metall o del complex (adsorció induïda) sobre la superfície de l'elèctrode, ja que la variació del

corrent límit amb la concentració total de lligand depèn del fenomen de l'adsorció (9-11).

Una manera de reduir aquest impacte és usar la tècnica de la polarografia inversa d'impulsos (RPP, reverse pulse polarography) (12). S'ha demostrat (11,13,14) que en condicions d'excés de lligand els corrents límits obtinguts amb aquesta tècnica no es veuen afectats per l'adsorció del metall o dels seus complexos si aquests són làbils.

## 2.3 Referències

1. Galceran, J. Electroanàlisi de complexos làbils metall-ligand amb adsorció induïda. Ph.D. Thesis. UB, 1994.
2. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 1980.
3. Companys, E. Speciation of heavy metals in macromolecular systems by electroanalytical techniques. Ph.D. Thesis. Universitat de Lleida (Spain), 2003.
4. Skoog, D. A.; Holler, F. A.; Nieman, T. A. *Principios de análisis instrumental*, Quinta ed.; 2001.
5. Lingane, James J. Interpretation of the Polarographic Waves of Complex Metal Ions. *Chem.Rev.* **1941**, *29*, 1-35.
6. Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach.*, Ellis Horwood Limited: Chichester, 1988.
7. Mota, A. M.; Correia dos Santos, M. M. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; pp 205-258.
8. DeJong, H. G.; Holub, K.; van Leeuwen, H. P. Voltammetry of Metal-Complex Systems with Different Diffusion- Coefficients of the Species Involved .1. Analytical Approaches to the Limiting Current for the General-Case Including Association Dissociation Kinetics. *J.Electroanal.Chem.* **1987**, *234*, 1-16.
9. Mas, F.; Puy, J.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; Casassas, E. Induced reactant adsorption in Normal Pulse Polarography of labile metal polyelectrolyte systems .1. Study of current potential relationship assuming potential-independent adsorption parameters. *J.Electroanal.Chem.* **1992**, *326*, 299-316.
10. Puy, J.; Galceran, J.; Cecilia, J.; Salvador, J.; Mas, F.; Esteban, M. *ESEAC'92.*, 1992 3-6-1992; Book of Abstracts 55.
11. Galceran, J.; Rene, D.; Salvador, J.; Puy, J.; Esteban, M.; Mas, F. Reverse Pulse Polarography of labile metal + macromolecule systems with induced reactant adsorption - Theoretical analysis and determination of complexation and adsorption parameters. *J.Electroanal.Chem.* **1994**, *375*, 307-318.
12. van Leeuwen, H. P.; Buffle, J.; Lovric, M. Reactant Adsorption in Analytical Pulse Voltammetry - Methodology and Recommendations - (Technical Report). *Pure Appl.Chem.* **1992**, *64*, 1015-1028.

- 
13. Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F.; Gimenez, D.; Esteban, M. Amalgamation effects in reverse pulse polarography at spherical electrodes. Influence on speciation measurements. *J.Electroanal.Chem.* **1998**, *442*, 151-167.
  14. Puy, J.; Torrent, M.; Monné, J.; Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Garcés, J. L.; Mas, F.; Berbel, F. Influence of the adsorption phenomena on the NPP and RPP limiting currents for labile metal-macromolecular systems. *J.Electroanal.Chem.* **1998**, *457*, 229-246.



# Capítol 3

La Bioassimilació i

la Bioacumulació



### 3. La bioassimilació i la bioacumulació

#### 3.1 Introducció

El creixement dels organismes que viuen en medis aquàtics depèn de l'assimilació de les quantitats adequades de molts elements que es troben en el medi en forma de traces. Alguns metalls traça, com el ferro, el zinc, el manganès i el coure, són necessaris pel seu creixement. Altres metalls, en canvi, o concentracions massa elevades dels metalls anteriors, produeixen efectes tòxics sobre els organismes. La concentració dels elements traça essencials presenta una clara davallada en la superfície de les zones fòtiques de llacs i oceans deguda a la assimilació biològica dels mateixos, sobre tot per part d'algues i organismes unicel·lulars com fitoplancton i bacteris. Com s'aprecia en la figura 3.1, tant el N com el P o el Si, i els nutrients traça com el Fe, Zn, Ni, Cu i Cd són literalment eliminats de les aigües superficials oceàniques per l'acció d'aquests microorganismes aquàtics.

Per altra banda, la contaminació per elements traça dels ambients naturals solen ser resultat de l'activitat humana. És necessari disposar de sistemes per avaluar els danys potencials d'aquesta contaminació per tal de poder dur a terme un gestió adequada dels mateixos.

L'assimilació i l'acumulació de metalls traça per part dels organismes es ve utilitzant de forma habitual com un indicador biològic per avaluar la contaminació i l'impacte biològic dels mateixos (1). L'ús d'assajos biològics sobre medis controlats és imprescindible per entendre i extrapolar conclusions als resultats dels assajos en medis naturals, però també es fa imprescindible un model teòric que, de forma senzilla, permeti determinar els valors del paràmetres rellevants en els processos implicats.

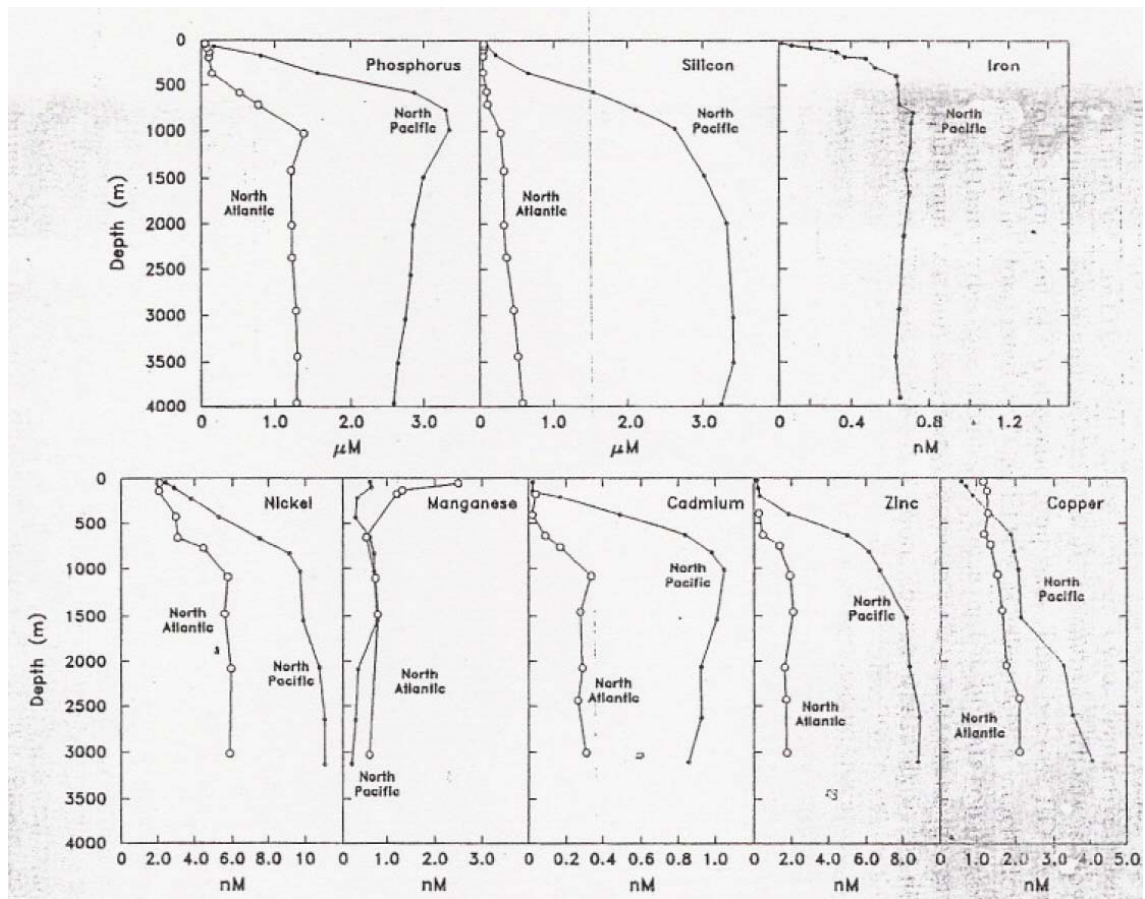


Figura 3.1 Perfils de concentració en oceà obert d'alguns elements bioactius dissolts. De la referència (2)

Els mecanismes que intervenen en l'assimilació d'elements metàl·lics traces per part d'organismes aquàtics en medis naturals juguen un paper fonamental tant pel que fa a la toxicitat com al subministrament de nutrients per part d'aquests elements respecte dels organismes. És un fet generalment acceptat(2) que els efectes biològics dels elements traça estan fortament influenciats per la seva especiació química en el medi extern, però no existeix un ple consens legal sobre el paper exacte d'aquesta especiació, i sovint es donen els valors límits acceptables d'un determinant contaminant en termes de la seva concentració total. (3). Per tal d'entendre l'especiació i l'efectivitat de la bioassimilació és fonamental fer una anàlisi acurada dels processos fisicoquímics que hi intervenen i, a partir d'aquesta, elaborar un model conceptual que descrigui la bioacumulació dels



metalls traça i refinar-lo a partir de la comparació del model teòric amb les desviacions aportades per les situacions experimentals reals.

## **3.2 Visió general de la bioassimilació i l'acumulació**

### **3.2.1 Processos implicats**

Algunes substàncies, inclosos alguns complexos de metalls traça, poden difondre's de forma passiva a una velocitat força elevada a través de la bicapa lipídica de la membrana cel·lular del microorganismes, que és la barrera fonamental entre l'interior d'un organisme unicel·lular i el seu medi extern. En la majoria dels cassos, però, els ions metàl·lics traça i els seus complexos presenten una solubilitat molt baixa en els lípids i, per tant, unes velocitats de difusió molt baixes a través de les membranes cel·lulars(1). La bioassimilació d'aquests elements traces es duu a terme, bàsicament, a través d'un procés que, de manera general, pot considerar-se en tres etapes. Primer, la difusió dels nutrients en el si del medi cap a la superfície de l'organisme. En aquesta fase, i en funció de les condicions mediambientals (canvis en el pH, existència de lligands en el medi, etc) es poden produir canvis en la especiació química de l'espècie M (complexació, dissociació,...). A continuació, l'adsorció de l'espècie metàl·lica en un seti específic de la membrana biològica (adsorció/desorció). I tercer, -encara que no sempre -, un procés d'internalització a través de la mateixa que condueix l'espècie a l'interior de l'organisme. La descripció cinètica de l'estat estacionari d'aquest procés d'assimilació pot formalitzar-se a través de l'equació de Michaelis-Menten.

Cada un d'aquests fluxos variarà depenent de la naturalesa química dels compostos que s'acumulen, la mida, la forma i el tipus de l'organisme, la naturalesa físico-química del medi, etc.

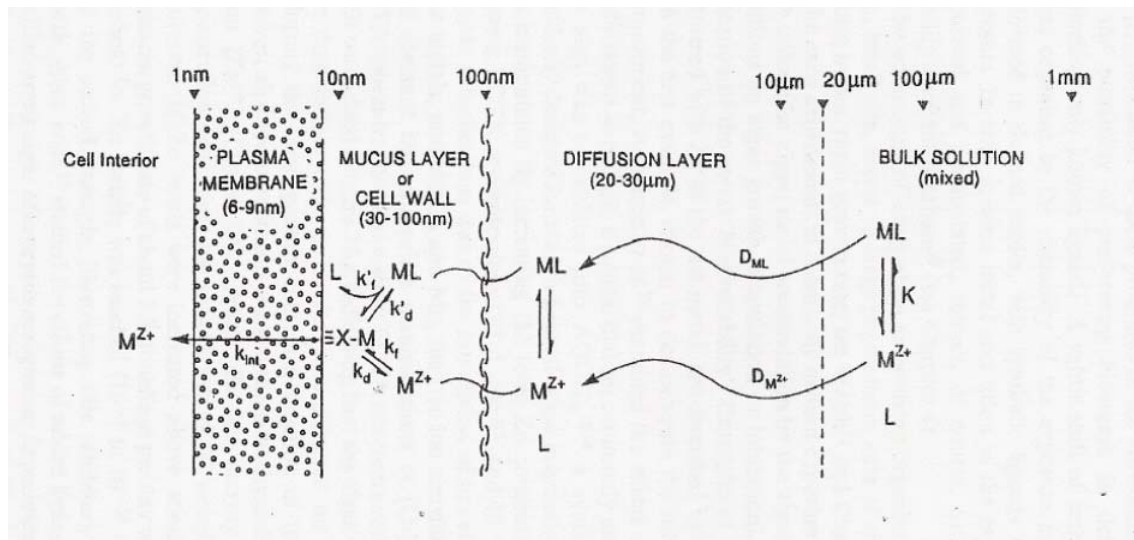


Figura 3.2 . Model conceptual de les interaccions metall- organisme.  $M^{Z+}$ =ió metàl·lic lliure; ML=complex metàl·lic en solució; M-X-membrana= complex metall superficial;  $k_f$ ,  $k'_f$  = constants de velocitat per la formació del complex superficial;  $k_d$ ,  $k'_d$  = constants de velocitat de dissociació del complex superficial;  $k_{int}$ = constant de velocitat per la internalització o transport del metall a través de la membrana biològica. Les càrregues sobre els lligands no es mostren per simplicitat. De la referència (4)

L'ampla varietat de setis que pot trobar-se el metall en arribar a la superfície de l'organisme, se sol classificar en dues categories(5): aquells que són fisiològicament inactius o inerts, i en els que el metall es diposita sense pertorbar el funcionament normal de la cèl·lula, i aquells fisiològicament actius, en els que el metall afecta el metabolisme cel·lular en quant es transferit cap a l'interior de l'organisme. Un cop dins la cèl·lula, el metall pot interactuar amb una gran varietat de setis intracel·lulars, amb diverses conseqüències metabòliques. Els primers tipus de setis, malgrat no afectar directament al metabolisme cel·lular, sí que tenen influència en la biodisponibilitat del metall, en funció de la fortalesa de la unió i de la labilitat del procés d'adsorció-desorció que s'estableix entre el metall i el seti corresponent.

La internalització del metall cap a l'interior de l'organisme afecta dos aspectes biològics rellevants. Per una banda la bioacumulació del metall en l'organisme, i per l'altra els efectes del metall sobre processos biològics tals com la fotosíntesi, respiració, motilitat, creixement i reproducció. Aquest segon aspecte està fora de l'abast del present treball, i

ens hem centrat en el primer com a eina per preveure i modelar la bioassimilació i els processos associats en funció de la disponibilitat de metall en el si (“bulk”) de la dissolució en el que s’ha dut a terme el cultiu o en el medi natural extern.

Els avantatges d’utilitzar algues com a organismes d’assaig biològics són evidents (mida petita, accés a grans poblacions, ràpid creixement, facilitat de cultiu,...) i estan ben documentats (6). Així, des dels inicis de l’experimentació amb algues s’ha treballat amb medis químicament ben definits per analitzar la bioacumulació de metalls, l’efecte de l’addició de metalls sobre el seu creixement (tant l’estimulació com la inhibició), i usar aquests paràmetres com a indicadors de la biodisponibilitat del metall(7,8).

### **3.2.2 Model de l’activitat del ió lliure (FIAM)**

Treballar en medis com aquests ha permès, per exemple, posar de manifest que la concentració lliure de metall (o activitat) és el principal factor d’influència sobre la bioassimilació del metall dissolt, la seva toxicitat o les seves possibilitats com a nutrient, més que la quantitat total de metall dissolt o la distribució del mateix entre diferents formes de complex. En la figura 3.3, per exemple, es mostren tres exemples de la importància de la concentració de  $Zn^{2+}$  lliure a l’hora de determinar la nutrició, la toxicitat i la bioassimilació de zinc per algues. Aquesta suposició és la hipòtesi bàsica del model conegut com FIAM (Free-Ion Activity Model) o model de l’activitat del ió lliure. Segons aquest model (1), per tal que un metall s’acumuli i provoqui una resposta

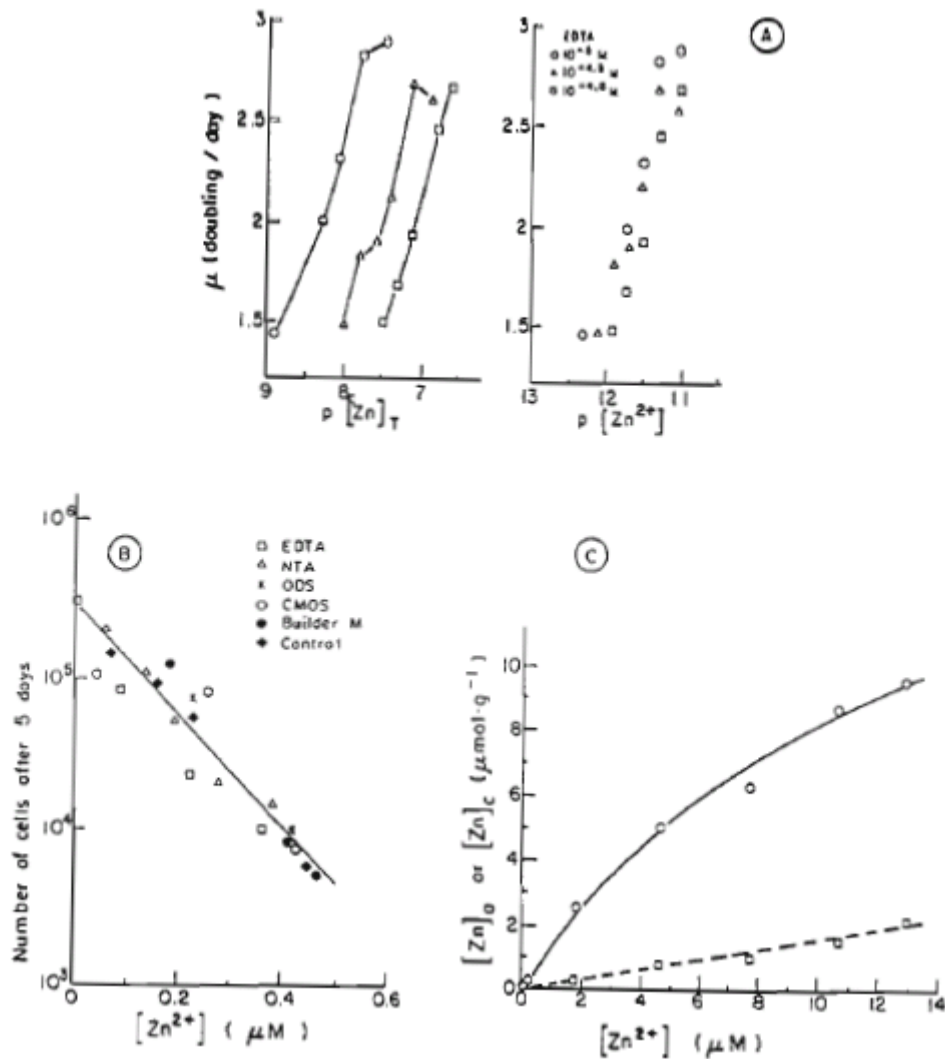
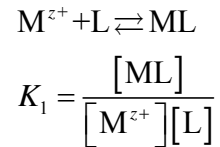


Figura 3.3. Exemples de la importància de  $[Zn^{2+}]$  en la determinació de la resposta de les algues: (A) velocitat de creixement ( $\mu$ ) en funció de la concentració total de Zn o de  $[Zn^{2+}]$  pel cas de creixement limitat pel Zn (concentracions molars). (B) Descens de creixement de les algues en funció de  $[Zn^{2+}]$  per sobre del llindar tòxic; (C) Assimilació de Zn en funció de  $[Zn^{2+}]$ .  $[Zn]_a$  i  $[Zn]_c$  representen el Zn adsorbit en la paret cel·lular (extret amb EDTA) i el Zn intracel·lular (resistent a l'extracció amb EDTA), respectivament.  $[Zn]_T$  es va mantenir constant (= 15.3 mM);  $[Zn^{2+}]$  es variava canviant el contingut de EDTA en el medi de cultiu. De la referència (1)

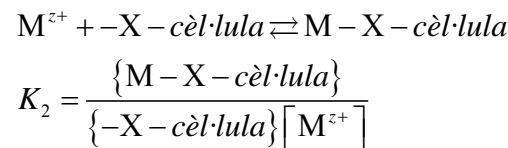
biològica en l'organisme ha d'interactuar o travessar una membrana cel·lular. Aquesta interacció del metall amb la superfície de l'organisme, que pot tenir lloc tant mitjançant el io lliure ( $M^{z+}$ ) com el complex metall-ligand (ML), pot representar-se en termes de la formació d'un complex superficial M-X-cèl·lula, on l'espècie -X-cèl·lula és un lligand cel·lular present a la superfície de l'organisme. (9-11).

En el cas més simple, quan el ió lliure interacciona amb els setis de la superfície cel·lular, es poden considerar les següents reaccions:

a) equilibri en la solució



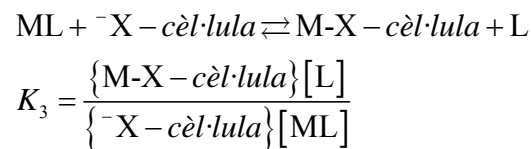
b) interacció de  $M^{z+}$  amb el seti de la superfície:



Reordenant, tenim  $\{M - X - cèl·lula\} = K_2 \cdot \{-X - cèl·lula\}[M^{z+}]$ , on  $K_1$  i  $K_2$  són constants d'equilibri, L és un lligand en solució, i s'han omès les càrregues dels complexos per simplicitat.

Se suposa que la resposta biològica és proporcional a la concentració del complex a la superfície de l'organisme,  $\{M - X - cèl·lula\}$ . Si la concentració dels setis  $-X - cèl·lula$  lliures es manté pràcticament constant, la darrera equació indica que l'activitat biològica varia directament com a funció de  $[M^{z+}]$ .

c) Interacció del complex amb els setis de la superfície:



Reordenant la segona equació i substituint en la darrera, tenim:

$\{M - X - cèl·lula\} = K_1 \cdot K_3 \{-X - cèl·lula\}[M^{z+}]$ , que manifesta la mateixa dependència de  $[M^{z+}]$  que l'equació anterior.

En qualsevol cas, sigui per la interacció del metall o per la del complex amb la superfície de l'organisme, la resposta biològica és proporcional a  $[M^{z+}]$ .

Diferents autors han suggerit possibles mecanismes que relacionen la formació del complex superficial M-X-cèl·lula i l'inici de l'efecte biològic (11-14). Si el lloc X-cèl·lula representa un seti fisiològicament actiu en la superfície de l'organisme, la unió del metall pot induir una resposta biològica directa (per exemple, en les brànquies del peixos). Alternativament, si el lloc correspon a un seti de transport que permet al metall M travessar la membrana i entrar en el citosol, aleshores la unió només produeix transport cap a l'interior de l'organisme, això és, la resposta biològica correspondrà a processos intracel·lulars que segueixen al transport. Una variant d'aquest esquema pot donar-se quan el lloc -X-cèl·lula correspon a un seti de transport utilitzat habitualment per un micronutrient essencial. La unió de M a aquest seti inhibirà el subministrament d'aquest element essencial i induirà un dèficit del mateix (e.g., fitoplancton: Mn/Cu, Fe/Cd).(11,14)

Els supòsits bàsic que fa aquest model són:

1. La membrana és el primer lloc d'interacció entre el metall i l'organisme;
2. aquesta interacció es pot descriure en termes d'un equilibri de complexació en el que es forma l'espècie M-X-cèl·lula;
3. el transport del metall en la solució cap a la membrana, i el subseqüent procés de complexació, són suficientment ràpids per poder considerar que s'estableix un pseudoequilibri entre l'espècie metàl·lica en el si de la solució i en la superfície biològica (ràpid en relació a l'assimilació del metall i a la resposta biològica de l'organisme);
4. la resposta biològica de l'organisme és estrictament dependent de la concentració del complex M-X-cèl·lula en la seva superfície;

5. en el rang de concentracions de metall d'interès toxicològic, la concentració de setis lliures {X-cèl·lula}, es manté pràcticament constant i les variacions de {M-X-cèl·lula} segueixen les de  $[M^{z+}]$  en la solució; i
6. durant l'exposició a l'acció del metall d'interès la superfície de la membrana biològica no experimenta canvis en la seva estructura ni conformació.

Es donen situacions, però, en les que el model sembla no funcionar correctament (4) ja sigui en sistemes de definició i control difícil ( medis naturals amb matèria orgànica dissolta), com en medis de laboratori ben definits.

En qualsevol cas, en les hipòtesis del FIAM, a la difusió se li adjudica un paper poc rellevant en els resultats del procés.

### 3.2.3 El model del lligand biotíc (BLM)

El model FIAM planteja que la resposta biològica (toxicitat o nutrició) d'un organisme depèn de la concentració de catió metàl·lic que hi ha lliure en el medi, no de la concentració total de metall. Aquest és un aspecte en el que l'especiació del metall, i per tant la interacció del mateix amb les diverses substàncies potencialment complexants presents en el medi, tenen una importància cabdal.

Tanmateix, hi ha moltes situacions en les quals la toxicitat d'un determinat metall no es deguda només a la presència (o absència) d'agents complexants que modifiquen la concentració de metall lliure, sinó per la presència d'altres metalls que interfereixen en la capacitat de l'organisme per ingerir metalls traces que li són essencials, com el  $Ca^{2+}$  (per exemple el Cd, Zn) (15) o la capacitat per regular el balanç de  $Na^{+}$  (Al, Ag, Cu) o altres cations fonamentals.

Els treballs de Playle (16) i col·laboradors demostren que l'assimilació d'un bon nombre de metalls, Cd, Cu i Ag entre ells, en les brànquies dels peixos poden provocar la seva mort, i que l'assimilació dels metalls es pot descriure amb un model d'equilibri químic

convencional en el qual la brànquia es tractava com un lligand, caracteritzat per una constant d'estabilitat i una concentració de setis reactius. En aquest model, inicialment anomenat "gill model", es va demostrar que la toxicitat del metall dissolt era proporcional a l'acumulació del metall en la brànquia. Aquestes conclusions es van estendre per analogia a altres organismes que eren massa petits per tenir òrgans en els que concretar i analitzar l'acumulació de metalls traça.

Aquests avenços es van concretar en el desenvolupament del model del lligand biòtic (Biotic Ligand Model, BLM) (17,18) que es una extensió del FIAM (aquest s'obté de l'anterior si els factors que no afecten la concentració de metall lliure, però afecten la seva toxicitat – per exemple, la duresa de l'aigua del medi – es mantenen constants). El BLM matemàticament incorpora la interacció dels metalls traça amb els lligands dissolts per predir la seva especiació i la seva conseqüent interacció amb els setis receptors de l'organisme. Des d'un punt de vista químic i matemàtic, l'organisme receptor es tracta com un lligand, "el lligand biòtic". Aquest model incorpora dos aspectes, un químic i l'altre biològic, que el permeten predir la toxicitat dels metalls dissolts basant-se en l'acumulació del metall en l'organisme receptor(19-21).

La precisió de les prediccions del model per la toxicitat del Cu es representa a la figura 3.4, que mostra els resultats de la toxicitat per una ampla varietat de mostres d'aigua de diferents ambients, amb composicions i químiques diverses. La línia contínua representa la toxicitat prevista pel model, i les línies discontinües representen un factor de dos per sobre i per sota d'aquell valor. Pràcticament tots els resultat es presenten en aquest marge.



LC50 Model Performance  
Fathead Minnow

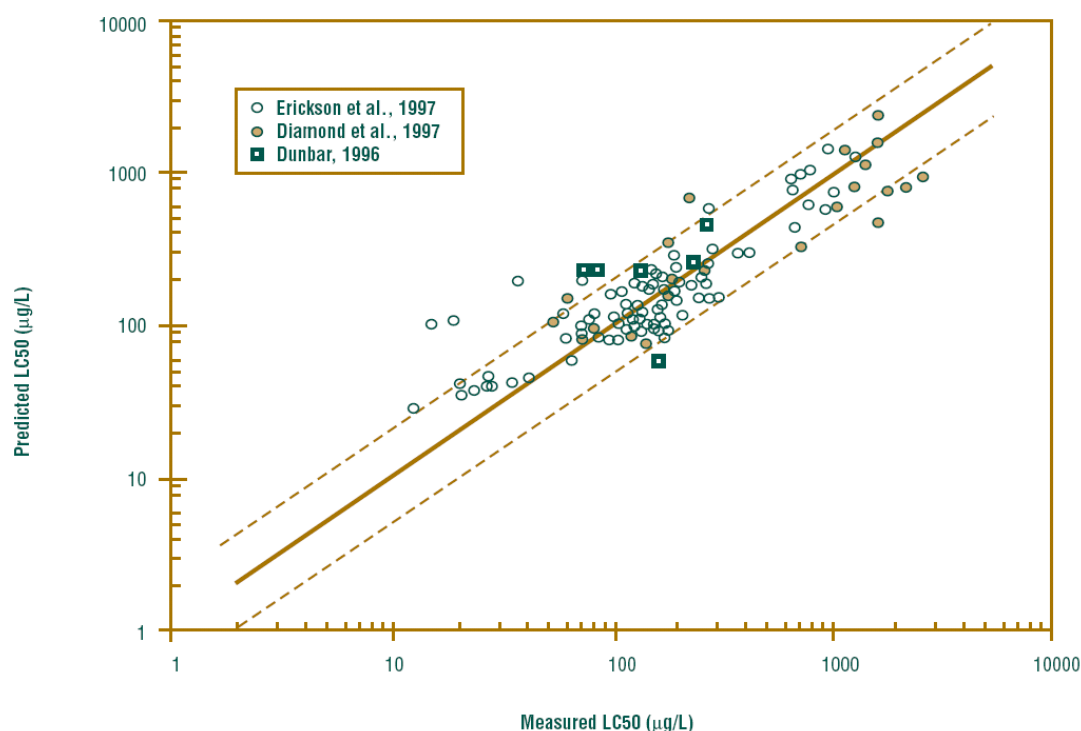


Figura 3.4. Mostra de la previsió de la toxicitat del coure feta amb el model BLM, respecte del valor mesurat en diversos ambients aquàtics. De (21)

### 3.3 Referències

1. Tessier, A.; Buffle, J.; Campbell, P. G. C. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*; Buffle, J., DeVitre, R. R., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1994; pp 197-230.
2. Morel, F. M. M.; Hering, J. G. In *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*; John Wiley: New York, 1993; pp 319-420.
3. Wilkinson, K. J.; Buffle, J. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester, UK, 2004; pp 445-533.
4. Campbell, P. G. C. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1995; pp 45-102.
5. van Leeuwen, H. P.; Pinheiro, J. P. Speciation dynamics and bioavailability of metals. Exploration of the case of two uptake routes. *Pure Appl.Chem.* **2001**, *73*, 39-44.
6. Walsh, G. E. Principles of toxicity testing with marine unicellular algae. *Environ.Toxicol.Chem.* **1988**, *7*, 979-987.
7. Anderson, M. A.; Morel, F. M. M.; Guillard, R. R. L. Growth limitation of a coastal diatom by low zinc ion activity. *Nature* **1978**, *276*, 70-71.
8. Morel, F. M. M.; Rueter, JG; Anderson, DM AQUIL - Chemically defined phytoplankton culture-medium for trace-metal studies. *J.Phycol.* **1979**, *15*, 135-141.

9. Castañe, P. M.; Topalian, M. L.; Cordero, R. R.; Salibian, A. Influencia de la especiación de los metales pesados en medio acuático como determinante de su toxicidad. *Rev.Toxicol.* **2003**, *20*, 13-18.
10. Nelson, PO; Chung, AK; Hudson, MC Factors affecting the fate of heavy-metals in the activated-sludge process. *Journal Water Pollution Control Federation* **1981**, *53*, 1323-1333.
11. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Effect of competitive interactions between manganese and copper on cellular manganese and growth in estuarine and oceanic species of the diatom thalassiosira. *Limnol.Oceanogr.* **1983**, *28*, 924-934.
12. Morel, F. M. M. *Principles and applications of aquatic chemistry*, Wiley: New York, 1983.
13. Pagenkopf, G. K. Gill Surface Interaction Model for trace-metal toxicity to fishes: role of complexation, pH, and water hardness. *Environ.Sci.Technol.* **1983**, *17*, 342-347.
14. Harrison, G. I.; Morel, F. M. M. Antagonism between cadmium and iron in the marine diatom thalassiosira-weissflogii. *J.Phycol.* **1983**, *19*, 495-507.
15. Allen, Herbert E. The significance of trace metal speciation for water, sediment and soil quality criteria and standards. *Sci.Total Envir.* **1993**, *134*, 23-45.
16. Playle, R. C. Modelling metal interactions at fish gills. *Sci.Total Envir.* **1998**, *219*, 147-163.
17. Di Toro, D. M.; Allen, H. E.; Bergman, H. L.; Meyer, J. S.; Paquin, P. R.; Santore, R. C. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ.Toxicol.Chem.* **2001**, *20*, 2383-2396.
18. Niyogi, S.; Wood, C. M. Biotic Ligand Model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ.Sci.Technol.* **2004**, *38*, 6177-6192.
19. Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, W. R.; Vigneault, B. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the Biotic Ligand Model. *Comp.Biochem.Physiol.C* **2002**, *133*, 189-206.
20. Paquin, P. R.; Gorsuch, J. W.; Apte, S.; Batley, G. E.; Bowles, K. C.; Campbell, P. G. C.; Delos, C. G.; Di Toro, D. M.; Dwyer, R. L.; Galvez, F.; Gensemer, R. W.; Goss, G. G.; Hogstrand, C.; Janssen, C. R.; McGeer, J. C.; Naddy, R. B.; Playle, R. C.; Santore, R. C.; Schneider, U.; Stubblefield, W. A.; Wood, C. M.; Wu, K. B. The biotic ligand model: a historical overview. *Comp.Biochem.Physiol.C* **2002**, *133*, 3-35.
21. Allen, H. E. The Biotic Ligand Model addresses effects of water chemistry on metal toxicity. *Fact Sheet on Environmental Risk Assessment* **2002**, 1-5.

# Capítol 4

## Els Canals Iònics



## 4. Els canals iònics

### 4.1 Introducció

El transport d'ions a través de canals iònics és un fenomen d'una importància fonamental en molts processos fisiològics i en el comportament normal de les cèl·lules. Un funcionament defectuós dels mateixos comporta una sèrie de malalties anomenades genèricament “canalpaties” i que poden arribar a tenir conseqüències importants per la salut humana o per la dels organismes i espècies afectades (1).

Els canals iònics són les vies més usuals que tenen les substàncies per entrar i sortir de les cèl·lules i per això resulten fonamentals des del punt de vista mèdic o biològic: són responsables de la transmissió d'impulsos en el sistema nerviós; de la coordinació en la contracció muscular, inclòs el múscle cardíac i estan involucrats en el transport en qualsevol cèl·lula o òrgan, per exemple el ronyó, l'intestí o en les glàndules endocrines(2). Una gran quantitat dels fàrmacs i drogues usats en medicina actuen de manera directa o indirecta sobre els canal iònics de les membranes cel·lulars (3) alterant la seva permeabilitat.

Els canals iònics consisteixen en una extensa varietat de proteïnes que, inserides en la bicapa lipídica de les membranes cel·lulars, presenten una configuració que ofereix un forat en el seu interior a través del qual poden circular diversos ions, depenent de la seva mida i les seves característiques, i controlen el flux a través seu en un i altre sentit.

Actualment hi ha classificats una gran quantitat de canals en funció del paper específic que desenvolupen en un sistema biològic(4). Alguns responen a estímuls mecànics (contacte), altres a potencials elèctrics (transmissió d'impulsos nerviosos), altres reaccionen davant de substàncies químiques específiques, ... Són altament selectius en la seva resposta i davant de què ho fan. S'obren i es tanquen en resposta als estímuls, en un procés anomenat “gating” i, quan estan oberts, només permeten el pas de determinats

tipus específics de ions. Són, per tant, selectius al tipus d'ió que els travessen. Així, per exemple, els canal de potassi permeten el pas d'aquest ió, però discriminen els ions sodi davant dels quals resulten impermeables. Naturalment, aquesta selectivitat és fonamental pel normal funcionament fisiològic de la cèl·lula, ja que la concentració de sodi és molt més alta a l'exterior de la cèl·lula que a l'interior, a la inversa que la del potassi. Sense aquesta selectivitat, aquest gradient de concentracions desapareixeria en un període de temps molt curt.

Des dels treballs de Hodgkin i Huxley (5) sobre la transmissió dels impulsos nerviosos, s'han realitzat una gran quantitat d'esforços per modelar la dinàmica del transport dels ions a través dels canals de les membranes biològiques (4,6). Els canals iònics en les membranes cel·lulars tenen un gran nombre d'àtoms, i si s'afegeix l'entorn lipídic i la presència de l'electròlit corresponent, el sistema esdevé força complex per un estudi acurat. L'estratègia habitual consisteix en construir un model més simple que funcioni i que sigui capaç de reproduir de manera raonable i correcta les propietats observades en el sistema. La importància de disposar de sistemes experimentals capaços de reproduir el comportament dels canals iònics naturals és evident i fonamental pel seu estudi. Tals sistemes permeten disposar de dades de forma immediata i controlada, permeten el control sobre el sistema i els estímuls aplicats, la reproductibilitat de les condicions i la possibilitat de variar els paràmetres experimentals, i també fan possible poder prescindir d'organismes o animals vius en l'experimentació corresponent. Aquests sistemes permeten obtenir un marc senzill per entendre i interpretar les dades experimentals, poden ser usats per fer prediccions sobre el comportament del sistema en condicions diferents i poden servir per relacionar les observacions experimentals amb arguments teòrics més fonamentals. Si, a més, es pot derivar una relació entre el model teòric

utilitzat i els paràmetres que necessàriament s'han de ajustar per obtenir una millor descripció de les dades disponibles, el model es fa més robust i adquireix categoria.

## 4.2 Canals iònics sobre monocapes lipídiques

Des dels treballs pioners de Miller i Bach (1969) (7) els elèctrodes de mercuri recoberts de monocapes fosfolipídiques s'han vingut utilitzant àmpliament com a mimètic de les membranes biològiques i així estudiar l'efecte dels camps elèctrics externs sobre l'estructura de les membranes lipídiques. S'han constatat comportaments i propietats similars de les interfases de monocapes lipídiques sobre gotes de mercuri amb altres models experimentals de membranes lipídiques dipositades sobre altres suports en condicions similars (8).

Se'ls ha incorporat molècules d'interès biològic (9-14), ions lipofílics (15), pèptids i proteïnes(16,17) amb la intenció d'esbrinar el seu comportament com a mimètics d'aquestes membranes biològiques. A potencials entre -0,2 i -0,7 V (vs. Ag/AgCl ) aquestes monocapes lipídiques tenen les cues hidrocarbonades dirigides cap a la superfície hidrofòbica del mercuri i els caps, polars, dirigits cap a la solució(18). Presenten una gran estabilitat mecànica, una alta resistència als camps elèctrics i una notable reproductibilitat. A potencials més positius o més negatius, la membrana es va desestabilitzant, es fa més prima i esdevé permeable a les reaccions faradaïques(18).

### 4.2.1 Canals iònics de gramicidina

La incorporació de gramicidina com element permeant a aquest model de membrana ha permès l'estudi de l'activitat i les propietats dels canals iònics (19-21). La gramicidina és una barreja heterogènia de tres tipus d'antibiòtic: Gramicidina A, Gramicidina B i Gramicidina C, que s'obtenen de l'espècie bacteriana *Bacillus brevis* i que s'anomenen col·lectivament Gramicidina D. Es tracta d'un pentadecapèptid lineal de fórmula general: formil-L-X-Gly-L-Ala-D-Leu-L-Ala-D-Val-L-Val-D-Val-L-Trp-D-Leu-L-Y-

D-Leu-L-Trp-D-Leu-L-Trp, on X i Y depèn del tipus de gramicidina. X pot ser valina o isoleucina. En la Gramicidina A, Y és triptòfan, en la B fenilalanina i en la C tirosina. Les configuracions estereoquímiques alternatives són de vital transcendència en la formació de la seva forma d'hèlix  $\beta$ , i aquesta és la responsable de formar canals iònics en membranes naturals i artificials. En el cas de membranes naturals, els canals de gramicidina consisteixen en dues unitats helicoïdals encarades del pèptid (figura 4.1), la longitud de les quals casa amb la de l'amplada de la doble capa lipídica d'aquest tipus de membranes. En el model de monocapa utilitzat de membrana, la longitud del monòmer coincideix amb el gruix de la monocapa de lípid.

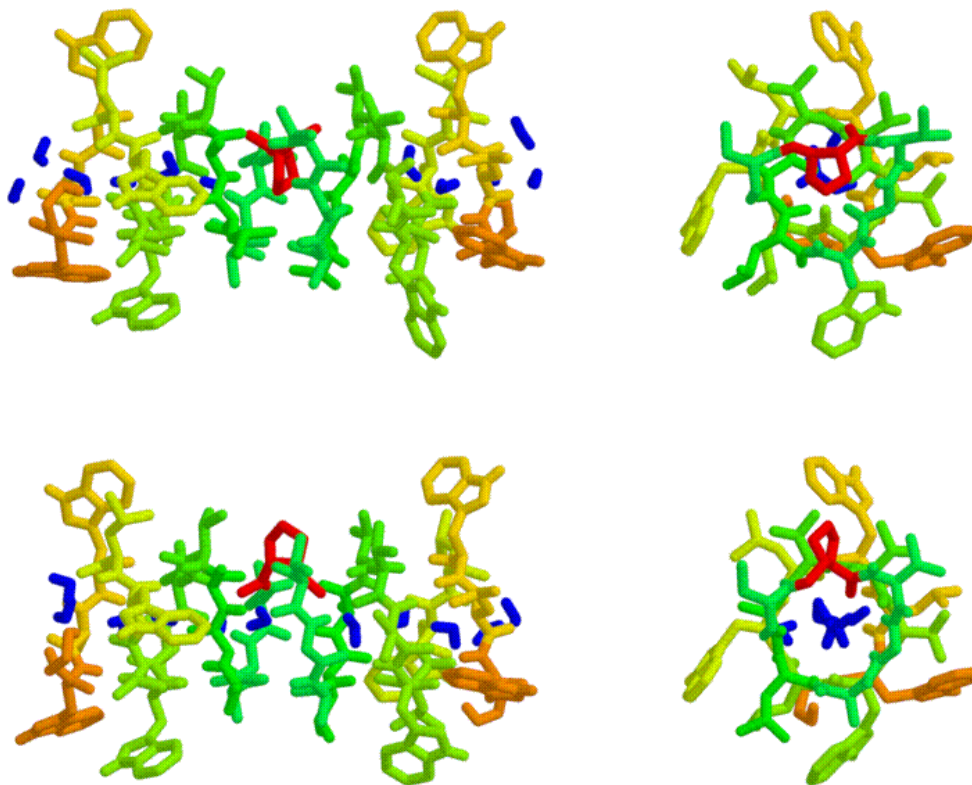


Figura 4.1: Vista lateral (esquerra) i frontal (dreta) del dímer de gramicidina A present en membranes naturals. Es posen de manifest els canvis conformationals implicats en el fenomen del “gating” amb les dues configuracions: tancada o inactiva (part superior) i oberta o activa (inferior) per la permeació de petites molècules (en color blau).

L'activitat bactericida de la gramicidina és resultat de l'augment de la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules bacterianes que permet que els cations inorgànics circulin



a través de la mateixa sense restriccions i es destrueixi el gradient iònic entre el citoplasma i l'entorn extracel·lular.

El paper de la gramicidina D com a canal iònic va ser demostrat per Hladky i Haydon (22), que investigaven les conductivitats dels canals individuals. En general, aquests canals són selectius per la majoria de cations monovalents, però son impermeables tant als cations divalents, com el  $\text{Ca}^{2+}$ , que s'uneix a llocs en les proximitats de la boca del canal i el bloquegen, com als anions. A l'interior dels canals, els cations monovalents s'han de moure en fila i han de desplaçar del seu interior les molècules d'aigua que l'omplen.

Aquest tipus de canal, en aquest model de membrana, s'ha demostrat que és el responsable del transport de  $\text{Tl}^+$  del si de la solució cap a la gota de mercuri a través de la monocapa, quan s'aplica una diferència de potencial a la mateixa.(21,23)

### **4.3 Marcs teòrics per analitzar la permeació**

Fins i tot el model de monocapa lipídica i amb un polipèptid senzill com és el cas de la gramicidina, resulta un sistema prou complex. De manera que la descripció detallada de les interaccions a les que es veuen sotmesos els ions que travessen els canal de gramicidina i dels canvis conformacionals que es produeixen en els mateixos en el procés del “gating”, esdevé complicada.

#### **4.3.1 Model de la Dinàmica Molecular**

En la estratègia que adopta la Dinàmica Molecular (Molecular Dynamics, MD) es fa una descripció microscòpica completa del canal iònic (24,25) i es descriuen les posicions, interaccions i trajectòries de tots els àtoms del sistema mitjançant les lleis de Newton. Òbviament, es fan necessaris sistemes computacionals i de càlcul molt potents per obtenir la descripció de l'evolució del sistema durant un període molt breu i distant de la duració real dels experiments (de l'ordre de 40 ms en el nostre cas).

### 4.3.2 Model del Continuum

En contraposició a les anteriors, també són habituals les teories que consideren l'electròlit com un medi continu per descriure macroscòpicament els processos físics que intervenen en la permeació dels canals iònics. Considerar el si de la dissolució com un medi continu va ser un plantejament que ha confirmat la seva validesa des de que es va proposar(26). Tanmateix, les seves aplicacions més recents, quan inclouen sistemes mesoscòpics, fan dubtar que les suposicions fetes pel si de la dissolució siguin acceptables per solucions confinades en volums petits. La longitud de Debye resulta un paràmetre adequat per caracteritzar el comportament del sistema. Si el sistema presenta unes dimensions superiors al valor d'aquest paràmetre, com és el cas de les proteïnes grans o les membranes superficials, l'aproximació del camp promig inherent en les teories del medi continu resulta acceptable. Però els porus de les membranes cel·lulars, que transporten ions cap a l'interior de les cèl·lules, solen tenir radis menors que la llargada de Debye(4) i l'aplicabilitat de les teories del medi continu a aquests sistemes és qüestionable.

### 4.3.3 Model de la Dinàmica Browniana

S'han desenvolupat, però, mètodes que estan a mig camí entre les dues visions. Sense tant de cost computacional, el mètode de la Dinàmica Browniana (BD), en la que només s'analitza el moviment dels ions, s'està utilitzant àmpliament i està donant resultats molts satisfactoris amb un cost computacional acceptable per un seguit de geometries tridimensionals reals (27-30).

### 4.3.4 Model macroscòpic

El nostre model per analitzar la permeació dels canal iònics de gramicidina en monocapes lipídiques sobre un elèctrode de gota de mercuri pot qualificar-se com un model de continu. Es basa en l'aplicació de les tècniques corresponents a la electrodifusió, en les que els corrents mesurat no corresponen als valors de canals

individuals sinó a través de multitud de canals sobre aquestes membranes, però incorporem la novetat de considerar col·lectivament tres processos claus: la difusió del ió del si de la dissolució cap a la superfície de la monocapa que conté la disposició de canals, la dinàmica conformacional dels canals individuals, considerant el procés d'activació-desactivació com un procés cinètic de primer ordre, i el pas dels ions a través dels canals.

En el capítol 7 es presentaran les bases matemàtiques que donen suport al model. En el capítol 11 es descriu l'aplicació del model a la interpretació dels corrents experimentals, es comprova la seva validesa, es detecten les seves febleses i s'obtenen els paràmetres que participen en la funció que descriu la permeabilitat local de la membrana modificada amb gramicidina. En el capítol 12 es presenta un refinament al model anterior i es prova la seva aplicabilitat a sistemes que incorporen additius que modifiquen la permeabilitat de la membrana. Tal sistema pot resultar de força interès per analitzar l'efecte que determinats additius poden tenir sobre l'activitat biològica o fisiològica derivada del pas d'espècies iòniques per les membranes cel·lulars. En el proper apartat següent es descriu el sistema experimental utilitzat per obtenir les dades de corrents.

#### **4.3.4.1 Sistema experimental**

Les dades que hem utilitzat per construir i contrastar el nostre model s'han obtingut a partir del dispositiu experimental següent. La gota de mercuri d'un elèctrode SMDE es recobreix d'una monocapa fosfolipídica de dioleoyl phosphatidylcholine (DOPC) que conté canals iònics de gramicidina com a sistema permeant. Un ió metàl·lic ( $TI^+$ ) en la solució es redueix en l'elèctrode de mercuri quan s'aplica un pols de potencial durant 40 ms, i es mesura el corrent obtingut com a funció resposta.

Els electrolits es desairegen completament amb argó de gran puresa i es manté una capa d'argó gas sobre l'electròlit durant tot l'experiment. Les monocapes de DOPC es dissolen en pentà i s'escampen en la interfase gas-aigua de la cel·la electroquímica (21,31). S'afegeix 3  $\mu\text{L}$  de gramicidina  $2.13 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  (SIGMA Chemicals Ltd) a la monocapa de la interfase gas-solució i es deixava reposar 10 minuts.

La gota de mercuri, nova per cada experiment, es recobreix de monocapa de lípid fent que la gota arrossegui la monocapa que es forma sobre la dissolució aquosa quan la gota es submergida lleugerament en la dissolució (vegeu la figura 4.2 ).

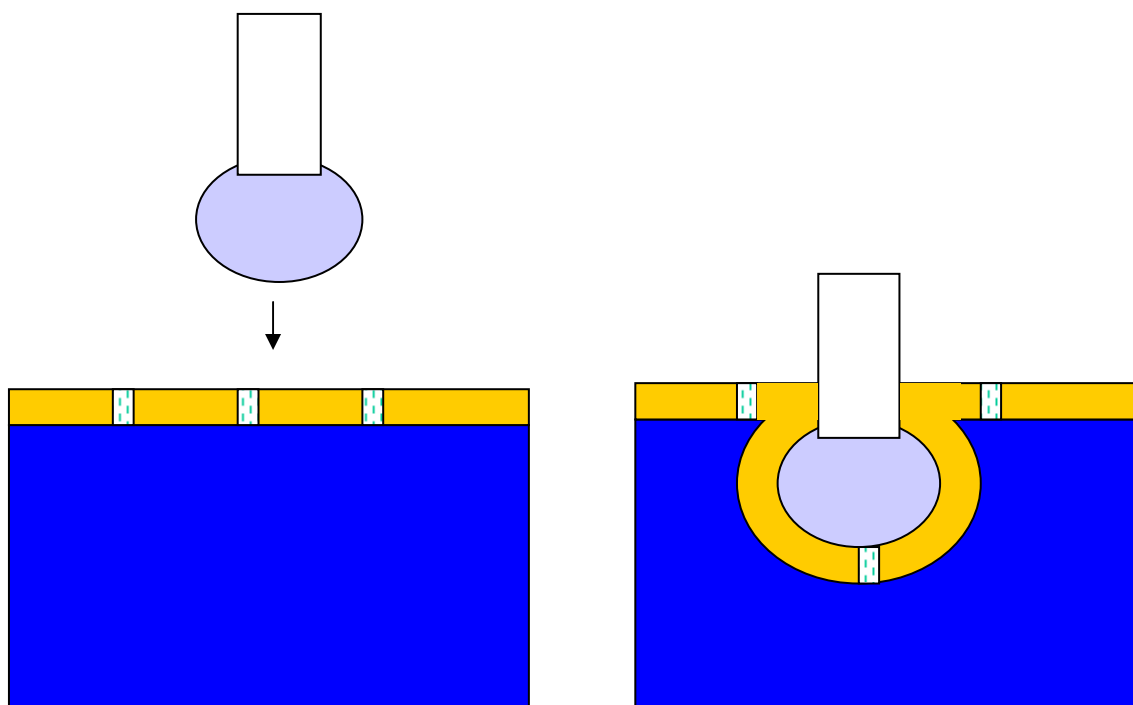


Figura 4.2: Procés experimental de deposició de la monocapa lipídica sobre l'elèctrode.

L'electròlit suport utilitzat és  $\text{KCl } 0.1 \text{ mol L}^{-1}$  preparat a partir de la sal que s'ha mantingut al forn a alta temperatura per evitar qualsevol resta de matèria orgànica.

L'experiment consisteix en una sèrie de passos de potencial aplicats a l'elèctrode. Els polsos, des de  $-0,2 \text{ V}$ , van cap a potencials progressivament més negatius, de  $-0,3 \text{ V}$  fins  $-0,7 \text{ V}$  en intervals de  $0.025 \text{ V}$ . Cada pols s'aplica durant  $0,04 \text{ s}$ , i entre polsos el

potencial es torna a  $-0,2$  V al menys durant 10 s per eliminar el Tl reduït sobre el mercuri. Es fan dues o tres rèpliques de l'escombrada de potencial endavant i endarrere (de  $-0,3$  a  $-0,7$  V i a l'inrevés) i es fan servir els valors mitjans dels corrents dels escombrats endavant per obtenir els valors mitjans dels paràmetres cinètics. En els experiments, l'ió electroactiu és  $Tl^+$ , introduït com una solució de treball de  $TlNO_3$  (SIGMA Chemicals Ltd). Les experiències es duen a terme amb un potenciostat Metrohm (E506 Polarecord) i les dades s'enregistren amb un sistema d'adquisició de dades Maclab (A and D instruments Ltd). Tots els potencials es prenen respecte l'elèctrode de referència Ag/AgCl:3.5 M KCl.

Aquest sistema experimental és el que s'ha usat per obtenir les dades experimentals utilitzades en el capítol 11 i, amb alguna petita modificació per l'addició dels additius, en el 12.

#### 4.4 Referències

1. Jentsch, T. J.; Hubner, C. A.; Fuhrmann, J. C. Ion channels: Function unravelled by dysfunction. *Nature Cell Biology* **2004**, *6*, 1039-1047.
2. Stryer, L. *Biochemistry*, 3rd ed.; W. H. Freeman: New York, 1988.
3. Schultz, S. G. Schultz, S. G. (Ed.) *Molecular biology of membrane transport disorders*, Plenum Press: New York, 1996.
4. Hille, B. Sinauer. (Ed.) *Ionic channels of excitable membranes*, Second ed.; Sunderland, MA, 2001.
5. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J. Physiol.* **1952**, *116*, 449-472.
6. Jordan, P. C. Electrostatic modeling of ion pores - energy barriers and electric-field profiles. *Biophys. J.* **1982**, *39*, 157-164.
7. MILLER, IR; BACH, D Structure and membrane properties of lecithin monolayers at polarized mercury/water interface. *J. Colloid. Interf. Sci.* **1969**, *29*, 250-
8. Almaleck, S. H.; Lairion, F.; Disalvo, E. A.; Gordillo, G. J. Lipid monolayers on Hg as a valid experimental model for lipid membranes under electrical fields. *Chem. Phys. Lipids* **2006**, *139*, 150-156.

9. Herrero, R.; Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Guidelli, R. Electroreduction of dioctadecylviologen in a self-assembled phospholipid monolayer on mercury and its role as an electron mediator. *J.Phys.Chem.B* **1997**, *101*, 2815-2823.
10. Herrero, R.; Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Guidelli, R. Adsorption and reduction kinetics of safranin T in self- assembled phospholipid monolayers deposited on mercury. *J.Electroanal.Chem.* **1997**, *425*, 87-95.
11. Herrero, R.; Moncelli, M. R.; Guidelli, R.; Carla, M.; Arcangeli, A.; Olivotto, M. Hybrid polar compounds produce a positive shift in the surface dipole potential of self-assembled phospholipid monolayers. *BBA-Biomembranes* **2000**, *1466*, 278-288.
12. Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Nelson, A.; Guidelli, R. Electrochemical modeling of electron and proton transfer to ubiquinone-10 in a self-assembled phospholipid monolayer. *Biophys.J.* **1996**, *70*, 2716-2726.
13. Moncelli, M. R.; Herrero, R.; Becucci, L.; Guidelli, R. Kinetics of electron and proton transfer to ubiquinone-10 and from ubiquinol-10 in a self-assembled phosphatidylcholine monolayer. *Biochimica et Biophysica Acta-Bioenergetics* **1998**, *1364*, 373-384.
14. Nelson, A. Voltammetry of retinal in phospholipid monolayers adsorbed on mercury. *J.Electroanal.Chem.* **1992**, *335*, 327-343.
15. Moncelli, M. R.; Herrero, R.; Becucci, L.; Guidelli, R. Adsorption of tetraphenylphosphonium and tetraphenylborate in self-assembled phosphatidylcholine and phosphatidylserine monolayers deposited on mercury-electrodes. *J.Phys.Chem.* **1995**, *99*, 9940-9951.
16. Lecompte, M. F.; Miller, I. R.; Elion, J.; Benarous, R. Interaction of prothrombin and its fragments with monolayers containing phosphatidylserine. 1. Binding of prothrombin and its fragment I to phosphatidylserine-containing monolayers. *Biochemistry* **1980**, *19*, 3434-3439.
17. Lecompte, M. F.; Miller, I. R. Interaction of prothrombin and its fragments with monolayers containing phosphatidylserine. 2. Electrochemical determination of lipid layer perturbation by interacting prothrombin and its fragments. *Biochemistry* **1980**, *19*, 3439-3446.
18. Nelson, A.; BENTON, A. Phospholipid monolayers at the mercury water interface. *J.Electroanal.Chem.* **1986**, *202*, 253-270.
19. Bizzotto, D.; Nelson, A. Continuing electrochemical studies of phospholipid monolayers of dioleoyl phosphatidylcholine at the mercury-electrolyte interface. *Langmuir* **1998**, *14*, 6269-6273.
20. Nelson, A. Electrochemical studies of thallium(I) transport across gramicidin modified electrode-adsorbed phospholipid monolayers. *J.Electroanal.Chem.* **1991**, *303*, 221-236.
21. Nelson, A.; Bizzotto, D. Chronoamperometric study of Tl(I) reduction at gramicidin- modified phospholipid-coated mercury electrodes. *Langmuir* **1999**, *15*, 7031-7039.
22. Hladky, S. B.; Haydon, D. A. Ion movements in gramicidin channels. *Current Topics in Membranes and Transport* **1984**, *21*, 327-372.
23. Rueda, M.; Navarro, I.; Ramirez, G.; Prieto, F.; Prado, C.; Nelson, A. Electrochemical impedance study of Tl<sup>+</sup> reduction through gramicidin channels in self-assembled gramicidin-modified dioleoylphosphatidylcholine monolayers on mercury electrodes. *Langmuir* **1999**, *15*, 3672-3678.
24. Roux, B; Karplus, M Molecular-dynamics simulations of the gramicidin channel. *ANNUAL REVIEW OF BIOPHYSICS AND BIOMOLECULAR STRUCTURE* **1994**, *23*, 731-761.
25. Roux, Benoit Theoretical and computational models of ion channels. *Current Opinion in Structural Biology* **2002**, *12*, 182-189.

- 
26. Bockris, J. O.; Reddy, A. K. M. *Modern Electrochemistry. Ionics*, 2nd ed.; Kluwer Academic/Plenum: New York, 2002.
  27. Allen, TW; Hoyles, M; Kuyucak, S Molecular and Brownian dynamics study of ion selectivity and conductivity in the potassium channel. *CHEMICAL PHYSICS LETTERS* **1999**, *313*, 358-365.
  28. Chung, SH; Hoyles, M; Allen, T et al. Study of ionic currents across a model membrane channel using Brownian dynamics. *Biophys.J.* **1998**, *75*, 793-809.
  29. Chung, SH; .; Allen, TW; Hoyles, M Permeation of ions across the potassium channel: Brownian dynamics studies. *Biophys.J.* **1999**, *77*, 2517-2533.
  30. Li, SC; Hoyles, M; Kuyucak, S; et al Brownian dynamics study of ion transport in the vestibule of membrane channels. *Biophys.J.* **1998**, *74*, 37-47.
  31. Nelson, A.; Auffret, N.; Borlakoglu, J. Interaction of hydrophobic organic-compounds with mercury adsorbed dioleoylphosphatidylcholine monolayers. *Biochim.Biophys.Acta* **1990**, *1021*, 205-216.





## II. Formalisme

### Matemàtic



# Capítol 5

Modelització de  
les Tècniques Electroanalítiques  
d'Impulsos



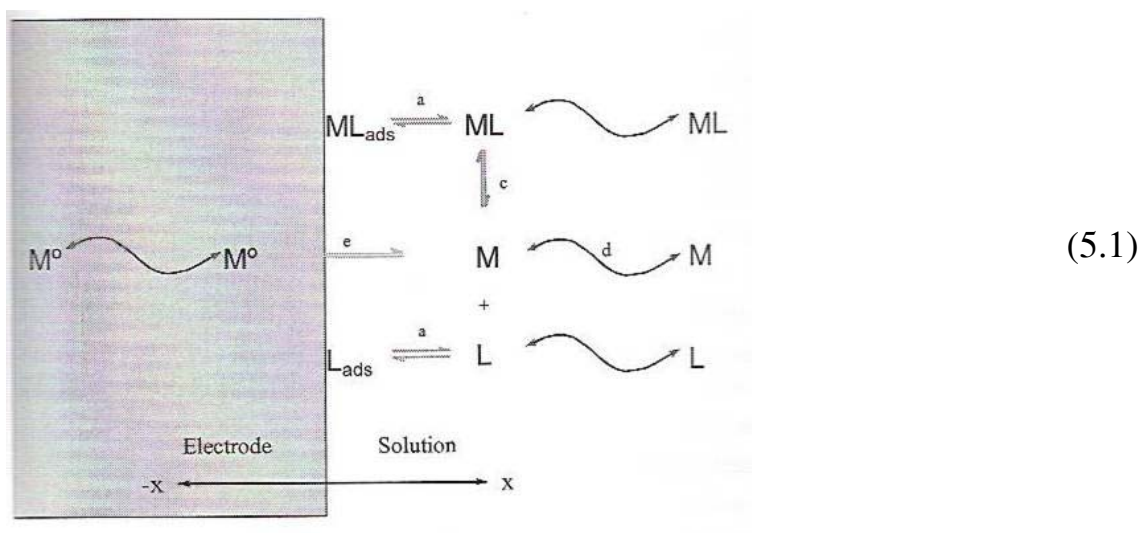
## 5. Modelització de les tècniques electroanalítiques d'impulsos

En el capítol 2 s'han presentat les característiques generals de les tècniques electroanalítiques d'impulsos que ens resulten d'interès. Així mateix, s'ha posat de manifest quina és la informació rellevant que aquestes tècniques ens aporten dels nostres sistemes, la metodologia d'ús de les mateixes i quins són els fenòmens físics o químics que hi estan involucrats.

En particular, ens interessa modelar les ones que s'obtidrien amb les tècniques NPP i RPP, en excés de lligand i sense excés de lligand, i determinar els valors dels corrents límits corresponents, per tal d'aplicar-ho, en un pas posterior (capítol 8), en la determinació de la influència que té l'adsorció sobre els corrents límits d'aquestes dues tècniques.

### 5.1 Descripció física del problema

Els fenòmens que concorren en el procés són la difusió de les espècies electroactives cap a l'elèctrode (d), la complexació amb un lligand (c), l'adsorció del lligand i del complex format en la superfície de l'elèctrode (a) i l'electroreducció (e), segons un programa de potencials predefinit segon la tècnica aplicada, que donen lloc a un esquema general que, de forma gràfica, pot representar-se per



on M és l'ió metàl·lic, ML el complex, L el lligand i  $M^0$  el metall reduït. La forma de tractar cada un d'aquestes fenòmens s'ha descrit per separat en l'apartat 1.2 del capítol introductori.

## 5.2 Formulació matemàtica

### 5.2.1 El cas general

Les equacions de les que parteix el nostre problema són les corresponents a la difusió de l'espècie reduïda ( $M^0$ ) (5.2), de l'ió metàl·lic (M) (5.3), del complex (ML) (5.4) i del lligand (L) (5.5), respectivament:

$$\frac{\partial c_{M^0}}{\partial t} = D_{M^0} \frac{\partial^2 c_{M^0}}{\partial x^2} \quad (5.2)$$

$$\frac{\partial c_M}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 c_M}{\partial x^2} + k_d c_{ML} - k_a \cdot c_M \cdot c_L \quad (5.3)$$

$$\frac{\partial c_{ML}}{\partial t} = D_{ML} \frac{\partial^2 c_{ML}}{\partial x^2} + k_a \cdot c_M \cdot c_L - k_d c_{ML} \quad (5.4)$$

$$\frac{\partial c_L}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L}{\partial x^2} + k_d c_{ML} - k_a \cdot c_M \cdot c_L \quad (5.5)$$

En el cas de reaccions molt ràpides, podem suposar que en tot lloc i moment s'assoleix l'equilibri químic

$$K = \frac{c_{ML}(x,t)}{c_M(x,t) \cdot c_L(x,t)}, \quad \forall (x,t) \in (0, \infty) \times (0, \infty) \quad (5.6)$$

D'aquesta darrera expressió en diem condició de labilitat. En aparèixer una nova equació algebraica, ens portarà a estalviar-nos una equació diferencial. Comencem definint les espècies formals metall total i lligand total ( $I,2$ ), de concentracions respectives,  $c_{T,M}$  i  $c_{T,L}$ ,

$$c_{T,M} = c_M + c_{ML} \quad (5.7)$$

i

$$c_{T,L} = c_L + c_{ML} \quad (5.8)$$

Podem reagrupar les equacions (5.3), (5.4) i (5.5) de manera que es cancel·lin els termes cinètics:

$$\frac{\partial c_{T,M}}{\partial t} = \frac{\partial c_M}{\partial t} + \frac{\partial c_{ML}}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 c_M}{\partial x^2} + D_{ML} \frac{\partial^2 c_{ML}}{\partial x^2} \quad (5.9)$$

i

$$\frac{\partial c_{T,L}}{\partial t} = \frac{\partial c_L}{\partial t} + \frac{\partial c_{ML}}{\partial t} = D_L \frac{\partial^2 c_L}{\partial x^2} + D_{ML} \frac{\partial^2 c_{ML}}{\partial x^2} \quad (5.10)$$

Les condicions inicials són de perfil homogeni “bulk”:

$$c_{T,M}(x, 0) = c_{T,M}^*, \quad c_{T,L}(x, 0) = c_{T,L}^*, \quad c_{M^0}(x, 0) = 0 \quad \forall x > 0 \quad (5.11)$$

i les de contorn:

a) a l'infinit:

$$\left. \begin{array}{l} c_{T,M}(x, t) = c_{T,M}^* \\ c_{T,L}(x, t) = c_{T,L}^* \\ c_{M^0}(x, t) = 0 \end{array} \right\} \forall t > 0, x \rightarrow \infty \quad (5.12)$$

b) a la superfície de l'elèctrode, que agafem com origen, se suposa reversibilitat

$$\frac{c_M(0, t)}{c_{M^0}(0, t)} = \exp \left[ \frac{nF}{RT} (E(t) - E_0) \right] \quad (5.13)$$

corresponent a l'equilibri nernstià d'oxidació-reducció. Cada tècnica polarogràfica defineix un programa de potencial específic a través de la funció  $E(t)$ .

Altres condicions corresponen als balanços de metall i de lligand a la superfície de l'elèctrode:

$$\frac{d\Gamma_{ML}(t)}{dt} = D_M \left( \frac{\partial c_M}{\partial x} \right)_{x=0} + D_{ML} \left( \frac{\partial c_{ML}}{\partial x} \right)_{x=0} + D_{M^0} \left( \frac{\partial c_{M^0}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5.14)$$

$$\frac{d\Gamma_{ML}(t)}{dt} + \frac{d\Gamma_L(t)}{dt} = D_{ML} \left( \frac{\partial c_{ML}}{\partial x} \right)_{x=0} + D_L \left( \frac{\partial c_L}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5.15)$$

on les concentracions superficials  $\Gamma_{ML}$  i  $\Gamma_L$  venen descrites per isoterms de Langmuir

$$\Gamma_{ML}(t) = \Gamma_{\max} \frac{k_{ML}c_{ML}(0,t)}{1 + k_{ML}c_{ML}(0,t) + k_Lc_L(0,t)} \quad (5.16)$$

i

$$\Gamma_L(t) = \Gamma_{\max} \frac{k_Lc_L(0,t)}{1 + k_{ML}c_{ML}(0,t) + k_Lc_L(0,t)} \quad (5.17)$$

Amb l'objectiu de facilitar la transformació i resolució del sistema anterior definim les variables adimensionals següents:

$$z_1 = \frac{c_{M^0}}{c_{T,M}^*}$$

$$z_2 = \frac{c_{T,M}}{c_{T,M}^*}$$

$$z_3 = \frac{c_{T,L}}{c_{T,L}^*}$$

$$z_4 = \frac{c_{ML}}{c_{ML}^*}$$

i

$$\xi = \frac{x}{\sqrt{D_{M^0} \cdot t_d}} \quad (5.19)$$

$$\tau = \frac{t}{t_d}$$

on  $t_d$  representa al temps de vida de la gota i correspon al moment en que es mesura la funció resposta (el corrent), tal com s'ha indicat en l'apartat 2.1 del capítol 2.

Amb aquestes noves variables, el sistema format per (5.2), (5.9), (5.10), es reescriu com:

$$\frac{\partial z_1}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 z_1}{\partial \xi^2}, \quad (5.20)$$



$$\frac{\partial z_2}{\partial \tau} = \frac{D_M}{D_{M^0}} \frac{\partial^2 z_2}{\partial \xi^2} + \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} \frac{D_{ML} - D_M}{D_{M^0}} \frac{\partial^2 z_4}{\partial \xi^2}, \quad (5.21)$$

$$\frac{\partial z_3}{\partial \tau} = \frac{D_L}{D_{M^0}} \frac{\partial^2 z_3}{\partial \xi^2} + \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} \frac{D_{ML} - D_L}{D_{M^0}} \frac{\partial^2 z_4}{\partial \xi^2} \quad (5.22)$$

per a tot valor de  $\xi$ .

Les condicions inicials (5.11):

$$z_1 = 0, \quad z_2 = 1, \quad z_3 = 1, \quad z_4 = 1 \quad \tau = 0, \forall \xi > 0, \quad (5.23)$$

Les condicions de contorn :

a) difusió plana semi-infinita (5.12)

$$\left. \begin{array}{l} z_1 = 0 \\ z_2 = 1 \\ z_3 = 1 \\ z_4 = 1 \end{array} \right\} \forall \tau > 0, \xi \rightarrow \infty, \quad (5.24)$$

b) a l'origen (5.13)

$$\frac{z_2(0, \tau) - \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} z_4(0, \tau)}{z_1(0, \tau)} = \exp \left[ \frac{nF}{RT} (E(\tau) - E_0) \right], \quad (5.25)$$

La relació de labilitat (5.6) s'escriu ara com:

$$K = \frac{c_{ML}^* z_4}{(c_{T,M}^* z_2 - c_{ML}^* z_4)(c_{T,L}^* z_3 - c_{ML}^* z_4)}, \quad \forall \xi \quad (5.26)$$

on, per claredat de la notació, s'han obviat les dependències amb les variables adimensionals d'espai i de temps.

Per reescriure les equacions (5.14) i (5.15) en termes de les noves variables, definim

$$G_2(\tau) = \frac{\Gamma_{\max}}{c_{T,M}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} \frac{k_{ML} c_{ML}^* z_4(0, \tau)}{1 + k_{ML} c_{ML}^* z_4(0, \tau) + k_L (c_{T,L}^* z_3(0, \tau) - c_{ML}^* z_4(0, \tau))}, \quad (5.27)$$

$$G_3(\tau) = \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TL}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} \frac{k_{ML} c_{ML}^* z_4(0, \tau) + k_L (c_{T,L}^* z_3(0, \tau) - c_{ML}^* z_4(0, \tau))}{1 + k_{ML} c_{ML}^* z_4(0, \tau) + k_L (c_{T,L}^* z_3(0, \tau) - c_{ML}^* z_4(0, \tau))} \quad (5.28)$$

de manera que els balanços de metall (5.14) i de lligand (5.15) a la superfície de l'elèctrode quedaran:

$$\frac{dG_2(\tau)}{d\tau} = \frac{D_M}{D_{M^0}} \left( \frac{\partial z_2}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} + \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} \frac{D_{ML} - D_M}{D_{M^0}} \left( \frac{\partial z_4}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} + \left( \frac{\partial z_1}{\partial \xi} \right)_{\xi=0}, \quad (5.29)$$

$$\frac{dG_3(\tau)}{d\tau} = \frac{D_L}{D_{M^0}} \left( \frac{\partial z_3}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} + \frac{c_{ML}^*}{c_{T,L}^*} \frac{D_{ML} - D_L}{D_{M^0}} \left( \frac{\partial z_4}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} \quad (5.30)$$

Per tal d'escriure de manera compacta el sistema format per les equacions anteriors definim els paràmetres:

$$D_1 = 1, \quad D_2 = \frac{D_M}{D_{M^0}}, \quad D_3 = \frac{D_L}{D_{M^0}}, \quad (5.31)$$

$$A_1 = 0, \quad A_2 = \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} \frac{D_{ML} - D_M}{D_{M^0}}, \quad A_3 = \frac{c_{ML}^*}{c_{T,L}^*} \frac{D_{ML} - D_M}{D_{M^0}} \quad (5.32)$$

i les funcions

$$B_1(\tau) = \left( \frac{\partial z_1}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} = G_1(\tau), \quad B_2(\tau) = \frac{dG_2(\tau)}{d\tau} - G_1(\tau), \quad B_3(\tau) = \frac{dG_3(\tau)}{d\tau} \quad (5.33)$$

de manera que el sistema format per (5.2), (5.9) i (5.10) queda formulat de forma compacta i indexada com:

$$\frac{\partial z_i}{\partial \tau} = D_i \frac{\partial^2 z_i}{\partial \xi^2} + A_i \frac{\partial^2 z_4}{\partial \xi^2}, \quad \forall (\xi, \tau) \in (0, \infty) \times (0, 1), \quad i=1, 2, 3 \quad (5.34)$$

i les condicions (5.29), (5.30) i la primera de les definicions (5.33) queden com:

$$D_i \left( \frac{\partial z_i}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} + A_i \left( \frac{\partial z_4}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} = B_i(\tau), \quad i=1, 2, 3 \quad (5.35)$$

### 5.2.1.1 Formulació discreta del problema

Els mètodes més habituals de resolució numèrica de sistemes d'equacions diferencials ordinàries o d'equacions diferencials en derivades parcials es basen en l'ús d'esquemes de diferències finites. Aquests mètodes, si bé senzills i directes, sovint resulten inestables i poc precisos. Un altra manera d'encarar el problema es utilitzar el mètode general dels residus ponderats, consistent en aproximar la solució mitjançant una funció espacial definida per un conjunt de funcions de base. Aleshores, els coeficients incògnites s'han de trobar de manera que es minimitzin els residus.

Aquí s'ha utilitzat el Mètode d'Elements Finitos de Galerkin (3-8) ja que resulta molt eficaç en la minimització de l'error en tot el domini del sistema. A més, com a funcions de base en l'engraellat s'han usat bases Lagrangianes lineals.

Apliquem primer el Mètode dels Residus Ponderats (3,9) a les parelles d'equacions de (5.34) i (5.35) amb el mateix índex per tal d'obtenir la formulació feble de la part diferencial del problema. Ens quedarà de la següent manera:

$\forall \omega \in V$ , on  $V$ : espai de funcions de test,

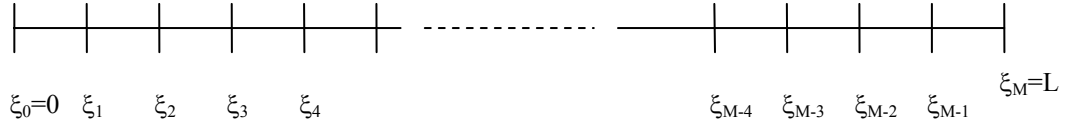
$$\int_0^{\infty} \omega(\xi) \left[ \frac{\partial z_i}{\partial \tau} - D_i \frac{\partial^2 z_i}{\partial \xi^2} - A_i \frac{\partial^2 z_4}{\partial \xi^2} \right] d\xi - \omega(0) \left[ D_i \left( \frac{\partial z_i}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} + A_i \left( \frac{\partial z_4}{\partial \xi} \right)_{\xi=0} - B_i(\tau) \right] = 0 \quad (5.36)$$

Integrant per parts la segona integral de cada una de les equacions anteriors, i substituint en les equacions respectives, aquestes es poden reescriure com:

$$\int_0^{\infty} \omega(\xi) \frac{\partial z_i}{\partial \tau} d\xi + \int_0^{\infty} \omega'(\xi) \left[ D_i \frac{\partial z_i}{\partial \xi} + A_i \frac{\partial z_4}{\partial \xi} \right] d\xi + \omega(0) \cdot B_i(\tau) = 0. \quad (5.37)$$

Discretitzem la part espacial i fixem una xarxa de punts. Com els fenòmens considerats tenen lloc a una distància molt curta de l'origen, restringim el càlcul a un segment finit

$[0, L]$ , on  $L$  és una distància (adimensional) a partir de la qual les concentracions són conegudes i iguals a les del bulk:



i triem una base d'interpoladors lineals (també anomenades funcions de test) definits en els  $M$  intervals per:

$$\omega_i(\xi) = \begin{cases} \frac{\xi - \xi_{i-1}}{\xi_i - \xi_{i-1}} & \text{si } \xi_{i-1} < \xi \leq \xi_i \\ \frac{\xi_{i+1} - \xi}{\xi_{i+1} - \xi_i} & \text{si } \xi_i < \xi \leq \xi_{i+1} \\ 0 & \text{altres punts} \end{cases}, \quad i = 1, \dots, M-1, \quad (5.38)$$

$$\omega_0(\xi) = \begin{cases} \frac{\xi_1 - \xi}{\xi_1} & \text{si } \xi_0 < \xi \leq \xi_1 \\ 0 & \text{altres punts} \end{cases} \quad (5.39)$$

$$\omega_M(\xi) = \begin{cases} \frac{\xi - \xi_{M-1}}{\xi_M - \xi_{M-1}} & \text{si } \xi_{M-1} < \xi \leq \xi_M \\ 0 & \text{altres punts} \end{cases} \quad (5.40)$$

Desenvolupem els  $z_i$  com (mètode de Galerkin) (3)

$$z_i = \omega_M(\xi) \cdot z_i^* + \sum_{k=0}^{M-1} m_i^k(\tau) \omega_k(\xi) \quad (5.41)$$

on les  $m_i^k$  són les variables associades a les concentracions de l'espècie (real o formal)  $i$  en el punt  $k$  de l'engraellat. Substituïm aquests desenvolupaments en les integrals (5.37)

prenent  $i=1, 2, 3$  ( $i=1: c_{M^0}/c_{T,M}^*$  ;  $i=2: c_{T,M}/c_{T,M}^*$  ;  $i=3: c_{T,L}/c_{T,L}^*$  . L'espècie corresponent a  $i=4$  és  $c_{ML}/c_{T,M}^*$  ). Ens queda :

$$\begin{aligned}
 \int_0^L \omega_j(\xi) \left[ \sum_{k=0}^{M-1} m_1^k(\tau) \cdot \omega_k(\xi) \right] d\xi + \int_0^L \omega_j'(\xi) D_1 \left[ z_1^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_1^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \\
 + \int_0^L \omega_j'(\xi) A_1 \left[ z_4^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_4^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \omega_j(0) \cdot B_1(\tau) = 0
 \end{aligned} \quad (5.42)$$

$$\begin{aligned}
 \int_0^L \omega_j(\xi) \left[ \sum_{k=0}^{M-1} m_2^k(\tau) \cdot \omega_k(\xi) \right] d\xi + \int_0^L \omega_j'(\xi) D_2 \left[ z_2^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_2^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \\
 + \int_0^L \omega_j'(\xi) A_2 \left[ z_4^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_4^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \omega_j(0) \cdot B_2(\tau) = 0
 \end{aligned} \quad (5.43)$$

i

$$\begin{aligned}
 \int_0^L \omega_j(\xi) \left[ \sum_{k=0}^{M-1} m_3^k(\tau) \cdot \omega_k(\xi) \right] d\xi + \int_0^L \omega_j'(\xi) D_3 \left[ z_3^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_3^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \\
 + \int_0^L \omega_j'(\xi) A_3 \left[ z_4^* \cdot \omega_M'(\xi) + \sum_{k=0}^{M-1} m_4^k(\tau) \cdot \omega_k'(\xi) \right] d\xi + \omega_j(0) \cdot B_3(\tau) = 0
 \end{aligned} \quad (5.44)$$

on  $j = 0, \dots, M-1$

L'avaluació de les integrals corresponents als productes de les funcions de test i als productes de les seves derivades porta al sistema d'equacions diferencials ordinàries que es pot escriure en forma matricial com:

$$\mathbb{C} \vec{m}_i'(\tau) + \mathbb{S} [D_i \vec{m}_i(\tau) + A_i \vec{m}_4] + \vec{p}_i(\tau) + \vec{g}_i'(\tau) = \vec{f}_i, \quad (5.45)$$

on els elements matricials corresponents són:

$$\left. \begin{aligned}
 \mathbb{C} = (c_{jk}) \quad c_{jk} = \int_0^L \omega_j(\xi) \omega_k(\xi) d\xi \\
 \mathbb{S} = (s_{jk}) \quad s_{jk} = \int_0^L \omega_j'(\xi) \omega_k'(\xi) d\xi
 \end{aligned} \right\} j, k = 0, \dots, M-1 \quad (5.46)$$

i els vectors corresponents:

$$\vec{m}_i(\tau) = \begin{pmatrix} m_i^0(\tau) \\ \vdots \\ m_i^{M-1}(\tau) \end{pmatrix} \quad i=1,2,3,4 \quad , \quad (5.47)$$

$$\vec{p}_1(\tau) = \begin{pmatrix} G_1(\tau) \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} , \vec{p}_2(\tau) = \begin{pmatrix} -G_1(\tau) \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} , \vec{p}_3(\tau) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} , \quad (5.48)$$

$$\vec{g}_1(\tau) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} , \vec{g}_2(\tau) = \begin{pmatrix} G_2(\tau) \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} , \vec{g}_3(\tau) = \begin{pmatrix} G_3(\tau) \\ 0 \\ \vdots \\ 0 \end{pmatrix} \quad (5.49)$$

i

$$\vec{f}_i(\tau) = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \\ \vdots \\ \frac{D_i z_i^* + A_i z_4^*}{h_M} \end{pmatrix} , \quad i=1,2,3 \quad (5.50)$$

L'avaluació dels elements matricials de  $\mathbb{C}$  i de  $\mathbb{S}$ , a partir de la base d'interpoladors escollida (5.39), (5.38) i (5.40) ens porta a les matrius tridiagonals

$$\mathbb{C} = \begin{pmatrix} \frac{h_1}{3} & \frac{h_1}{6} & 0 & \dots & 0 \\ \frac{h_1}{6} & \frac{h_1+h_2}{3} & \frac{h_2}{6} & \dots & 0 \\ 0 & \frac{h_2}{6} & \frac{h_2+h_3}{3} & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & \dots & \frac{h_{M-1}}{6} & \frac{h_{M-1}+h_M}{3} \end{pmatrix} \quad (5.51)$$

$$\mathbb{S} = \begin{pmatrix} \frac{1}{h_1} & -\frac{1}{h_1} & 0 & \dots & 0 \\ -\frac{1}{h_1} & \frac{1}{h_1} + \frac{1}{h_2} & -\frac{1}{h_2} & \dots & 0 \\ 0 & -\frac{1}{h_2} & \frac{1}{h_2} + \frac{1}{h_3} & \dots & 0 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ 0 & \dots & \dots & -\frac{1}{h_{M-1}} & \frac{1}{h_{M-1}} + \frac{1}{h_M} \end{pmatrix} \quad (5.52)$$

Es discretitza ara la part temporal de les equacions (5.45) seguint un  $\theta$ -esquema de diferències finites (10),

$$\frac{F(t+\Delta t)-F(t)}{\Delta t} = \theta G(t+\Delta t) + (1-\theta)G(t) \quad (5.53)$$

i reordenant l'equació (5.45) com

$$\mathbb{C} \vec{m}'_i(\tau) = \vec{f}_i - \vec{p}_i(\tau) - \vec{g}'_i(\tau) - \mathbb{S} [D_i \vec{m}_i(\tau) + A_i \vec{m}_4] \quad (5.54)$$

ens queda:

$$\begin{aligned} \mathbb{C} \frac{m_i(\tau + \Delta\tau) - m_i(\tau)}{\Delta\tau} &= \vec{f}_i - \theta \vec{p}_i(\tau + \Delta\tau) - (1-\theta) \vec{p}_i(\tau) - \mathbb{S} D_i [\theta m_i(\tau + \Delta\tau) + (1-\theta) m_i(\tau)] - \\ &\quad - \mathbb{S} A_i [\theta m_4(\tau + \Delta\tau) + (1-\theta) m_4(\tau)] - \left( \frac{\vec{g}_i(\tau + \Delta\tau) - \vec{g}_i(\tau)}{\Delta\tau} \right) \end{aligned} \quad (5.55)$$

i, en definitiva:

$$\begin{aligned} &\frac{1}{\Delta\tau} \mathbb{C} m_i(\tau + \Delta\tau) + \theta \vec{p}_i(\tau + \Delta\tau) + \mathbb{S} D_i \theta m_i(\tau + \Delta\tau) + \mathbb{S} A_i \theta m_4(\tau + \Delta\tau) + \frac{1}{\Delta\tau} \vec{g}_i(\tau + \Delta\tau) \\ &= \vec{f}_i - (1-\theta) \vec{p}_i(\tau) + \frac{1}{\Delta\tau} \vec{g}_i(\tau) - \mathbb{S} D_i (1-\theta) m_i(\tau) - \mathbb{S} A_i (1-\theta) m_4(\tau) + \frac{1}{\Delta\tau} \mathbb{C} m_i(\tau) \end{aligned} \quad (5.56)$$

per  $i = 1, 2$  i  $3$ .

Reagrupant termes i introduint les matrius:

$$\begin{aligned} \mathbb{Z}M_i &= \frac{1}{\Delta\tau} \mathbb{C} + \theta D_i \mathbb{S} \quad , \quad \mathbb{Z}N_i = \theta D_i \mathbb{S} \quad , \\ \mathbb{Q}M_i &= \frac{1}{\Delta\tau} \mathbb{C} - (1-\theta) D_i \mathbb{S} \quad , \quad \mathbb{Q}N_i = -(1-\theta) D_i \mathbb{S} \end{aligned} \quad i = 1, 2 \text{ i } 3 \quad (5.57)$$

totes elles tridiagonals i simètriques, s'obté un conjunt d'equacions que queda com

$$\boxed{\begin{aligned} \mathbb{ZM}_i m_i(\tau + \Delta\tau) + \mathbb{ZN}_i m_4(\tau + \Delta\tau) + \theta \vec{p}_i(\tau + \Delta\tau) \frac{1}{\Delta\tau} \vec{g}_i(\tau + \Delta\tau) = \\ = \vec{f}_i + \mathbb{QM}_i m_i(\tau) + \mathbb{QN}_i m_4(\tau) - (1 - \theta) \vec{p}_i(\tau) + \frac{1}{\Delta\tau} \vec{g}_i(\tau) \end{aligned}} \quad (5.58)$$

Aquest esquema ens aporta  $3M$  equacions a les que s'afegeixen les  $M$  relacions de labilitat (5.26) exigides en cada un dels nodes de la malla escollida:

$$K \left( c_{T,M}^* m_2^j(\tau) - c_{ML}^* m_4^j(\tau) \right) \left( c_{T,L}^* m_3^j(\tau) - c_{ML}^* m_4^j(\tau) \right) - c_{ML}^* m_4^j(\tau) = 0, \quad (5.59)$$

$$j = 0, \dots, M-1$$

i les corresponents a les condicions de contorn a l'origen (5.25), (5.27) i (5.28)

$$m_2^0(\tau) - \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} m_4^0(\tau) - m_1^0(\tau) \exp \left[ \frac{nF}{RT} (E(\tau) - E_0) \right] = 0, \quad (5.60)$$

$$G_2(\tau) \left( 1 + k_{ML} c_{ML}^* m_4^0(\tau) + k_L \left( c_{T,L}^* m_3^0(\tau) - c_{ML}^* m_4^0(\tau) \right) \right) - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{T,M}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} k_{ML} c_{ML}^* m_4^0(\tau) = 0 \quad (5.61)$$

i

$$\begin{aligned} G_3(\tau) \left( 1 + k_{ML} c_{ML}^* m_4^0(\tau) + k_L \left( c_{TL}^* m_3^0(\tau) - c_{ML}^* m_4^0(\tau) \right) \right) - \\ - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TL}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} \left( k_{ML} c_{ML}^* m_4^0(\tau) + k_L \left( c_{TL}^* m_3^0(\tau) - c_{ML}^* m_4^0(\tau) \right) \right) = 0 \end{aligned} \quad (5.62)$$

Tot plegat, disposem d'un sistema de  $4M+3$  equacions per trobar  $4M+3$  incògnites: les  $4M$  components dels vectors  $m_i(\tau)$ ,  $i=1, 2, 3$ , i  $4$  (corresponents, respectivament, a les variables associades a les concentracions de  $M^0$ , les espècies formals metall total i lligand total i complex ML) i les tres variables auxiliars  $G_1(\tau)$ ,  $G_2(\tau)$  i  $G_3(\tau)$ .

El mapa de les equacions corresponents, separades per blocs, es pot veure a la figura 1, i resulta fàcilment programable per ser resolt, per a cada valor de  $t$ , de manera automatitzada.



Els tres primers blocs corresponen a les equacions de difusió (5.58). Fem un canvi de nomenclatura de  $\tau$  a  $t$  per facilitar la comprensió. Per l'índex  $m_1(t)$ , associat a l'espècie  $M^0$ , tenim les primeres M equacions:

$$ZM_1m_1^0(t + \Delta t) + \theta G_1(t + \Delta t) = QM_1m_1^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) \quad (5.63)$$

$$ZM_1m_1^i(t + \Delta t) = QM_1m_1^i(t) \quad i = 1, M - 2 \quad (5.64)$$

$$ZM_1m_1^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{z_1^*}{h_M} + QM_1m_1^{M-1}(t) \quad (5.65)$$

Per l'índex  $m_2(t)$ , associat a l'espècie formal metall total, tenim M equacions més:

$$\begin{aligned} ZM_2m_2^0(t + \Delta t) + ZN_2m_4^0(t + \Delta t) - \theta G_1(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t}G_2(t + \Delta t) = \\ = QM_2m_2^0(t) + QN_2m_4^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) + \frac{1}{\Delta t}G_2(t) \end{aligned} \quad (5.66)$$

$$ZM_2m_2^i(t + \Delta t) + ZN_2m_4^i(t + \Delta t) = QM_2m_2^i(t) + QN_2m_4^i(t) \quad i = 1, M - 2 \quad (5.67)$$

$$ZM_2m_2^{M-1}(t + \Delta t) + ZN_2m_4^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{D_2z_2^* + A_2z_4^*}{h_M} + QM_2m_2^{M-1}(t) + QN_2m_4^{M-1}(t) \quad (5.68)$$

El tercer bloc de M equacions corresponen a l'índex  $m_3(t)$ , associat a la concentració de l'espècie formal lligand total,  $c_{T,L}/c_{T,L}^*$ :

$$ZM_3m_3^0(t + \Delta t) + ZN_3m_4^0(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t}G_3(t + \Delta t) = QM_3m_3^0(t) + QN_3m_4^0(t) + \frac{1}{\Delta t}G_3(t) \quad (5.69)$$

$$ZM_3m_3^i(t + \Delta t) + ZN_3m_4^i(t + \Delta t) = QM_3m_3^i(t) + QN_3m_4^i(t) \quad i = 1, M - 2 \quad (5.70)$$

$$ZM_3m_3^{M-1}(t + \Delta t) + ZN_3m_4^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{D_3z_3^* + A_3z_4^*}{h_M} + QM_3m_3^{M-1}(t) + QN_3m_4^{M-1}(t) \quad (5.71)$$

El quart bloc correspon a les condicions de labilitat (5.59) que ens aporten M equacions més:

$$\frac{c_{ML}^*m_4^i(t)}{K \cdot c_{TM}^*} - \left( m_2^i(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*}m_4^i(t) \right) \times \left( \frac{c_{TL}^*}{c_{TM}^*}m_3^i(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*}m_4^i(t) \right) = 0 \quad (5.72)$$

El cinquè bloc està constituït per les tres equacions de contorn (5.60), (5.61) i (5.62):

$$m_2^0(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*} m_4^0(t) - m_1^0(t) \cdot \exp\left[\frac{nF}{RT}(\varepsilon(t) - \varepsilon_0)\right] = 0$$

$$G_2(t) \times \left(1 + K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t))\right) - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TM}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) = 0 \quad \text{i}$$

$$G_3(t) \times \left(1 + K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t))\right) - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TM}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} \left(K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t))\right) = 0$$

Un cop establert el sistema d'equacions, la estratègia de resolució passa per la discretització temporal i la implementació d'un programa Fortran que permet resoldre numèricament el sistema per obtenir les concentracions de totes les espècies involucrades en el procés, en els diferents punts de l'engraellat espacial, en cada pas de temps considerat. Això permet, per exemple, obtenir els perfils de concentració de les diferents espècies en un instant determinat, o obtenir la resposta a un determinat programa de potencials aplicats al sistema segons la tècnica d'impulsos escollida o el corrent mesurat en cada moment, aplicant la relació (2.4) descrita en el capítol 2 d'aquesta tesi.

$ZM_1 m_1^0(t + \Delta t) + \theta G_1(t + \Delta t) = QM_1 m_1^0(t) - (1 - \theta)G_1(t)$	0
$ZM_1 m_1^i(t + \Delta t) = QM_1 m_1^i(t)$	$i = 1, M - 2$
$ZM_1 m_1^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{z_1^*}{h_M} + QM_1 m_1^{M-1}(t)$	$M - 1$
$ZM_2 m_2^0(t + \Delta t) + ZN_2 m_4^0(t + \Delta t) - \theta G_1(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t} G_2(t + \Delta t) = QM_2 m_2^0(t) + QN_2 m_4^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) + \frac{1}{\Delta t} G_2(t)$	
$ZM_2 m_2^i(t + \Delta t) + ZN_2 m_4^i(t + \Delta t) = QM_2 m_2^i(t) + QN_2 m_4^i(t)$	$i = 1, M - 2$
$ZM_2 m_2^{M-1}(t + \Delta t) + ZN_2 m_4^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{D_2 z_2^* + A_2 z_4^*}{h_M} + QM_2 m_2^{M-1}(t) + QN_2 m_4^{M-1}(t)$	
$ZM_3 m_3^0(t + \Delta t) + ZN_3 m_4^0(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t} G_3(t + \Delta t) = QM_3 m_3^0(t) + QN_3 m_4^0(t) + \frac{1}{\Delta t} G_3(t)$	
$ZM_3 m_3^i(t + \Delta t) + ZN_3 m_4^i(t + \Delta t) = QM_3 m_3^i(t) + QN_3 m_4^i(t)$	$i = 1, M - 2$
$ZM_3 m_3^{M-1}(t + \Delta t) + ZN_3 m_4^{M-1}(t + \Delta t) = \frac{D_3 z_3^* + A_3 z_4^*}{h_M} + QM_3 m_3^{M-1}(t) + QN_3 m_4^{M-1}(t)$	
$\frac{c_{ML}^* m_4^i(t)}{K \cdot c_{TM}^*} - \left( m_2^i(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*} m_4^i(t) \right) \times \left( \frac{c_{TL}^*}{c_{TM}^*} m_3^i(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*} m_4^i(t) \right) = 0$	$i = 0, M - 1$
$m_2^0(t) - \frac{c_{ML}^*}{c_{TM}^*} m_4^0(t) - m_1^0(t) \cdot \exp\left[ \frac{nF}{RT} (\varepsilon(t) - \varepsilon_0) \right] = 0$	
$G_2(t) \times \left( 1 + K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t)) \right) - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TM}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) = 0$	
$G_3(t) \times \left( 1 + K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t)) \right) - \frac{\Gamma_{\max}}{c_{TM}^* \sqrt{D_{M^0} t_d}} \left( K_{ML} c_{ML}^* m_4^0(t) + K_L \cdot (c_{TL}^* m_3^0(t) - c_{ML}^* m_4^0(t)) \right) = 0$	

Figura 5.1: Mapa del sistema de 4M+3 equacions corresponent al problema làbil sense excés de lligand. Els tres primers blocs corresponen al sistema (5.58), el quart bloc a les condicions de labilitat (5.59), i el cinquè a les equacions (5.60), (5.61) i (5.62) respectivament.

## 5.2.2 El cas amb excés de lligand

Si suposem un gran excés de lligand, podem fer les aproximacions:

$$c_{T,M}^* \ll c_{T,L}^* = c_L^* + c_{ML}^* \approx c_L^* \quad (5.73)$$

$$c_{T,L}(x, t) = c_L(x, t) = c_L^* \quad \forall x, t \quad (5.74)$$

L'anterior hipòtesi aplicada a la relació de labilitat ens permet establir les relacions:

$$K = \frac{c_{ML}}{c_M \cdot c_L} = \frac{c_{ML}}{c_M \cdot c_L^*} \Rightarrow c_{ML} = K' \cdot c_M \quad (5.75)$$

$$c_{T,M} = c_M + K' \cdot c_M = (1 + K')c_M \quad (5.76)$$

$$c_{T,M} = c_{ML} + \frac{c_{ML}}{K'} = \left( \frac{1 + K'}{K'} \right) c_{ML} \quad (5.77)$$

que aplicades a l'anterior sistema (5.2), (5.9) i (5.10) el redueixen a

$$\frac{\partial c_{M^0}(x,t)}{\partial t} = D_{M^0} \frac{\partial^2 c_{M^0}(x,t)}{\partial x^2}$$

i

$$\frac{\partial c_{TM}(x,t)}{\partial t} = D_T \frac{\partial^2 c_{TM}(x,t)}{\partial x^2} \quad (5.78)$$

on hem definit aquest coeficient de difusió mitjà,  $D_T$ , com:

$$D_T = \frac{D_M + K' \cdot D_{ML}}{1 + K'} \quad (5.79)$$

Per completar el sistema d'equacions (5.2) i (5.78) afegim les condicions inicials:

$$c_{T,M}(x,0) = c_{T,M}^*, \quad c_{M^0}(x,0) = 0 \quad \forall x \geq 0 \quad (5.80)$$

i les de contorn:

- a) la difusió semi-infinita, que prescriu que prou lluny de la superfície de l'elèctrode la concentració de l'espècie metall total es manté inalterada i la de metall reduït sempre és nul·la:

$$\left. \begin{array}{l} c_{T,M}(x,t) = c_{T,M}^* \\ c_{M^0}(x,t) = 0 \end{array} \right\} \forall t > 0, x \rightarrow \infty \quad (5.81)$$

- b) a l'origen, la hipòtesi de reversibilitat implica

$$\frac{c_M(0,t)}{c_{M^0}(0,t)} = \exp\left[\frac{nF}{RT}(E(t) - E_0)\right] \quad (5.82)$$

corresponent a l'equilibri nernstià d'oxidació-reducció, i la que correspon a l'adsorció de complex a la superfície de l'elèctrode:

$$\frac{d\Gamma_{ML}(t)}{dt} = D_T \left( \frac{\partial c_{TM}}{\partial x} \right)_{x=0} + D_{M^0} \left( \frac{\partial c_{M^0}}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (5.83)$$

$$\text{on } \Gamma_{ML}(t) = \Gamma_{\max} \frac{K_T c_{T,M}(0,t)}{1 + K_L c_L^*(0,t) + K_T c_{T,M}(0,t)} \quad (5.84)$$

$$\text{amb } K_T = K_{ML} \cdot \frac{K'}{1 + K'} \quad (5.85)$$

Aplicant la mateixa discretització espacial i temporal del sistema i fent servir la mateixa nomenclatura matricial que en el cas general, el sistema d'equacions que ara ens afecta queda reduït, per cada valor de  $t$ , a  $2M+2$  equacions i  $2M+2$  incògnites, les corresponents a les concentracions de  $M^0$ , la total de metall TM, i les variables auxiliars  $G_1$  i  $G_2$ . El mapa d'aquestes equacions, separades en blocs, és el representat a la fig. 2.

El primer bloc de  $M$  equacions correspon a la difusió associada a l'índex  $m_1(t)$ , relacionat amb l'espècie  $M^0$ :

$$ZM_1m_1^0(t + \Delta t) + \theta G_1(t + \Delta t) - QM_1m_1^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) = 0 \quad (5.86)$$

$$ZM_1m_1^i(t + \Delta t) - QM_1m_1^i(t) = 0 \quad i = 1, M - 2 \quad (5.87)$$

$$ZM_1m_1^{M-1}(t + \Delta t) - QM_1m_1^{M-1}(t) = 0 \quad (5.88)$$

El segon bloc de  $M$  equacions correspon a l'índex  $m_2(\tau)$ , associat a l'espècie formal metall total:

$$ZM_2m_2^0(t + \Delta t) - \theta G_1(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t}G_2(t + \Delta t) - QM_2m_2^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) - \frac{1}{\Delta t}G_2(t) = 0 \quad (5.89)$$

$$ZM_2m_2^i(t + \Delta t) - QM_2m_2^i(t) = 0 \quad i = 1, M - 2 \quad (5.90)$$

$$ZM_2m_2^{M-1}(t + \Delta t) - \frac{D_2z_2^*}{h_M} - QM_2m_2^{M-1}(t) = 0 \quad (5.91)$$

i finalment les dues equacions corresponents a les condicions de contorn a l'origen de reversibilitat electroquímica i la d'adsorció a la superfície de l'elèctrode:

$$m_2^0(t) - m_1^0(t)(1 + k') \cdot \exp\left[\frac{nF}{RT}(E(t) - E_0)\right] = 0 \quad (5.92)$$

$$G_2(t) \left(1 + K_L c_L^* + K_T \cdot c_{TM}^* m_2^0(t) \cdot \sqrt{D_{M^0} t_d}\right) - \Gamma_{\max} K_T m_2^0(t) = 0 \quad (5.93)$$

$ZM_1m_1^0(t + \Delta t) + \theta G_1(t + \Delta t) - QM_1m_1^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) = 0$	$i = 0$
$ZM_1m_1^i(t + \Delta t) - QM_1m_1^i(t) = 0$	$i = 1, M - 2$
$ZM_1m_1^{M-1}(t + \Delta t) - QM_1m_1^{M-1}(t) = 0$	$i = M - 1$
$ZM_2m_2^0(t + \Delta t) - \theta G_1(t + \Delta t) + \frac{1}{\Delta t}G_2(t + \Delta t) - QM_2m_2^0(t) - (1 - \theta)G_1(t) - \frac{1}{\Delta t}G_2(t) = 0$	$i = 0$
$ZM_2m_2^i(t + \Delta t) - QM_2m_2^i(t) = 0$	$i = 1, M - 2$
$ZM_2m_2^{M-1}(t + \Delta t) - \frac{D_2z_2^*}{h_M} - QM_2m_2^{M-1}(t) = 0$	$i = M - 1$
$m_2^0(t) - m_1^0(t)(1 + k') \cdot \exp\left[\frac{nF}{RT}(E(t) - E_0)\right] = 0$	
$G_2(t)\left(1 + K_Lc_L^* + K_T \cdot c_{TM}^* m_2^0(t) \cdot \sqrt{D_{M^0}t_d}\right) - \Gamma_{\max} K_T m_2^0(t) = 0$	

Figura 5.2: Mapa del sistema de 2M+2 equacions corresponent al problema làbil amb excés de lligand.

### 5.3 Aplicació a les diferents tècniques electròdiques

L'aplicació de les equacions anteriors a les diferents tècniques, pel cas general, passa per adaptar les equacions a les condicions particulars que cada tècnica imposa segons l'instant de temps considerat de la vida de la gota. El programa de potencials aplicats en cada moment, per les tècniques que ens interessin, ja s'ha descrit al capítol 2. Per tant, ara concretarem com s'han de particularitzar les equacions anteriors segons el moment considerat. Descriurem aquesta concreció a la generació de l'ona corresponent i al càlcul del corrent límit en les tècniques de NPP i RPP, pel cas general de qualsevol valor de la relació metall-ligand.

#### 5.3.1 Polarografia Normal d'impulsos (NPP)

##### 5.3.1.1 Generació de l'ona NPP

Per generar el polarograma NPP cal calcular, pel potencial aplicat en cada gota, el valor del corrent corresponent per aplicació de l'equació (2.4). Per això ens resulta necessari la concentració les diverses espècies que intervenen en el procés i, en conseqüència, la resolució del sistema d'equacions anteriors per cada potencial del programa

corresponent de la tècnica. En aquest cas, el programa s'ha descrit en l'apartat 1.1 del capítol 2.

En cada gota, el primer esglaó correspon a les condicions de potencial prou oxidant i no s'ha format gens de producte ( $M^0$ ). Després de  $t_0$  (moment d'aplicació del pols de potencial, el mateix per cada gota) s'aplica el potencial corresponent al de cada gota, cada cop més reductor. Això és, per cada pols de potencial del programa:

- Primer esglaó de cada gota. Abans de  $t_0$ :
  - Per les condicions del potencial no hi ha gens de  $M^0$ . Fem, per tant,  $m_i^i(t) = 0$  (de  $i=0$  fins  $i=M-1$ ) en les equacions (5.63), (5.65) i (5.64), primer bloc de la fig. 1,
  - Les equacions de la (5.66) a la (5.72) no es modifiquen, ja que corresponen a la difusió i les condicions de labilitat de les diverses espècies presents
  - A l'equació (5.60) hem de fer  $m_1^0=0$  i queda
 
$$m_2^0(\tau) - \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} m_4^0(\tau) = 0 \quad (5.94)$$
  - Les equacions (5.61) i (5.62) no es veuen alterades.
- Després de  $t_0$ :
  - Totes les equacions del sistema, de la (5.63) fins a la (5.72) i les (5.60), (5.61) i (5.62) es queden tal com s'han definit.

En la figura 3 es mostra la ona NPP generada pel programa Fortran utilitzat en la simulació, fent servir dades sintètiques i les condicions temporals indicades en les línies anteriors. Els diferents gràfics corresponent a diferents valors de la concentració total de lligand, amb la resta de dades iguals.

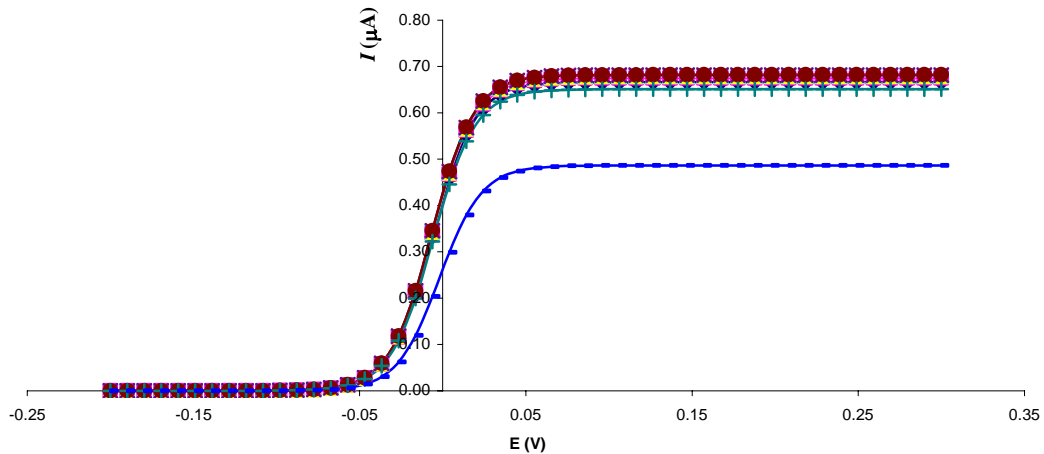


Figura 5.3: Ona NPP generada amb el programa numèric, en llenguatge FORTRAN, elaborat per simular aquesta tècnica, usant les condicions descrites en 5.3.1.1. Les diferents línies corresponen a valors diferents de concentració total de lligand.

### 5.3.1.2 Càlcul del corrent límit en NPP

En les condicions del corrent límit, tal com s'ha comentat en el capítol 2, abans de  $t_0$  el potencial és oxidant i, per tant, no tenim gens de metall reduït ( $M^0$ ). Després de  $t_0$  el potencial és molt reductor (estaríem en les condicions de les darreres gotes del programa que genera l'ona anterior). Això es tradueix en el següent esquema d'equacions:

- Abans de  $t_0$  (es repeteixen les condicions comentades en 5.3.1.1, abans de l'aplicació del pols):
  - Primer bloc de la figura 5.1: Fem  $m_1^i(t) = 0$  en les equacions (5.63), (5.64) i (5.65)
  - Resten inalterades les equacions de la (5.66) a la (5.72) (blocs 2, 3 i 4 de la figura 5.1).
  - En l'equació (5.60) hem de fer  $m_1^0(t) = 0$  (equivalent a fer  $G_1=0$  en l'equació (5.33)),
  - Les equacions (5.61) i (5.62) resten inalterades.



- Després de  $t_0$ :
  - El primer, segon i tercer blocs de la figura 1, equacions de la (5.63) fins a (5.71) queden tal com estan, sense modificació,
  - les equacions (5.72) corresponents a la labilitat, quart bloc de la figura 1 s'han de deixar com estan, però en la primera d'elles (la corresponent a l'índex  $i=0$ ) hem de fer  $m_4^0(t) = 0$  per tal d'evitar incongruències matemàtiques, ja que com tenim un potencial molt reductor, no hi ha metall lliure sobre la superfície de l'elèctrode i tampoc pot haver-hi complex. És a dir, com  $c_M(0)=0$  per un potencial molt reductor,  $c_{ML}(0)=K \cdot c_M(0) \cdot c_L(0)=0$ .
  - En el cinquè bloc de 1 (condicions de contorn en la superfície de l'elèctrode), com que  $m_4^0(t) = 0$ , fem les transformacions següents. En (5.60) fem  $m_2^0(t) = 0$  (el metall total a la superfície és zero) ; en (5.61) fem  $G_2=0$  (en realitat,  $G_2(1 + K_L c_{TL}^* m_3^0(t)) = 0$ , però el contingut del parèntesi no pot anul·lar-se); i finalment, (5.62) queda com  $G_3(1 + k_L c_{TL}^* m_3^0(t)) - \frac{\Gamma_{\max}}{\sqrt{D_{M^0} t_d}} c_{TM}^* k_L m_3^0(t) = 0$ .

### 5.3.2 Polarografia Inversa d'Impulsos (RPP)

El programa de potencials corresponent a aquesta tècnica s'ha descrit en l'apartat 1.2 del capítol 2. La definició del corrent límit també s'ha comentat en aquest apartat i és diferent de la de la tècnica NPP, ja que aquí s'ha de calcular com la diferència dels corrents corresponents a potencials molt reductors i potencials molt oxidants.

Aquesta tècnica resulta d'especial interès ja que, com es comenta en el capítol 8, el valor del corrent límit no resulta afectat per la possible presència d'adsorció de metall o complex (11) en determinades condicions.

### 5.3.2.1 Generació de l'ona RPP

En cada gota, el primer esglaó té un potencial comú i molt reductor (condicions de corrent límit en NPP). El segon esglaó, en canvi, depèn del potencial aplicat a cada gota. Així tindrem:

- Abans de  $t_0$  es donen les condicions descrites en l'apartat 5.3.2, en la secció “després de  $t_0$ ”, és a dir :

- El primer, segon i tercer blocs de la figura 1, equacions de la (5.63) fins a (5.70) queden tal com estan, sense modificació,
- les equacions (5.72) corresponents a la labilitat, quart bloc de la figura 1 s'han de deixar com estan, però en la primera d'elles (la corresponent a l'índex  $i=0$ ) hem de fer  $m_4^0(t) = 0$  per tal d'evitar incongruències matemàtiques, ja que com tenim un potencial molt reductor, no hi ha metall lliure sobre la superfície de l'elèctrode i tampoc pot haver-hi complex. És a dir, com  $c_M(0)=0$  per un potencial molt reductor,  $c_{ML}(0)=K \cdot c_M(0) \cdot c_L(0)=0$ .
- En el cinquè bloc de 1 (condicions de contorn en la superfície de l'elèctrode), com que,  $m_4^0(t) = 0$  fem les transformacions següents. En (5.60) fem  $m_2^0(t) = 0$  (el metall total a la superfície és zero) ; en (5.61) fem  $G_2=0$  (en realitat,  $G_2(1 + K_L c_{TL}^* m_3^0(t)) = 0$ , però el contingut del parèntesi no pot anul·lar-se); i finalment, (5.62) queda com

$$G_3(1 + k_L c_{TL}^* m_3^0(t)) - \frac{\Gamma_{\max}}{\sqrt{D_{M^0} t_d}} c_{TM}^* k_L m_3^0(t) = 0 .$$

- Després de  $t_0$  s'han de contemplar totes les condicions del sistema d'equacions de la figura 5.1 sense restriccions, des de l'equació (5.63) fins a la (5.62)

### 5.3.2.2 Càlcul del corrent límit RPP

El corrent límit s'obté com la diferència entre  $I_{RPP,DC}$  i  $I_{RPP,RP}$ . Aquests dos valors s'obtenen quan els valors del potencial del segon esglaó són, molt reductor en el primer cas, i molt oxidant en el segon.

	Primera gota (potencial molt reductor en el segon esglaó)		Segona gota (potencial molt oxidant en el segon esglaó)	
	$t < t_0$	$t \geq t_0$	$t < t_0$	$t \geq t_0$
Primer bloc	(5.63) (5.64) (5.65)	(5.63) (5.64) (5.65)	(5.63) (5.64) (5.65)	$m_1^i(t) = 0$ a (5.63) (5.64) (5.65)
Segon bloc	(5.66) (5.67) (5.68)	(5.66) (5.67) (5.68)	$G_1=0$ a (5.66) (5.67) (5.68)	(5.66) (5.67) (5.68)
Tercer bloc	(5.69) (5.70) (5.71)	(5.69) (5.70) (5.71)	(5.69) (5.70) (5.71)	(5.69) (5.70) (5.71)
Quart Bloc	$m_4^0(t) = 0$ a (5.72)	$m_4^0(t) = 0$ en (5.72)	$m_4^0(t) = 0$ en (5.72)	(5.72)
Equació 4M+1	$m_2^0(t) = 0$ a (5.60)	$m_2^0(t) = 0$ a (5.60)	$m_1^0(t) = 0$ a (5.60)	$m_1^0(t) = 0$ a (5.60)
Equació 4M+2	$G_2=0$ a (5.61)	$G_2=0$ a (5.61)	$G_2=0$ a (5.61)	(5.61)
Equació 4M+3	$G_3(1+k_L c_{TL}^* m_3^0(t)) - \frac{\Gamma_{max}}{\sqrt{D_{M^0} t_d}} c_{TL}^* k_L m_3^0(t) = 0$	$G_3(1+k_L c_{TL}^* m_3^0(t)) - \frac{\Gamma_{max}}{\sqrt{D_{M^0} t_d}} c_{TL}^* k_L m_3^0(t) = 0$	$G_3(1+k_L c_{TL}^* m_3^0(t)) - \frac{\Gamma_{max}}{\sqrt{D_{M^0} t_d}} c_{TL}^* k_L m_3^0(t) = 0$	(5.62)

Taula 5.4: Adaptacions a fer en el mapa d'equacions de la fig.5.1 per les dues gotes a considerar per tal de determinar el valor del corrent límit RPP sense excés de lligand.

Caldrà considerar, per tant, dues gotes i per cada una d'elles, analitzar les equacions abans i després de  $t_0$ . En la taula 5.4 es descriuen les adaptacions i/o modificacions que

s'hauran de posar en el programa per cada un dels intervals temporals, en cada bloc d'equacions de la fig. 1.

L'aplicació d'aquestes condicions en el programa numèric elaborat a cada una de les gotes en condicions extremes de potencial, ens permetrà trobar el corrent en l'elèctrode per cada una d'elles, i de la seva diferència podrem trobar el corrent límit RPP.

## 5.4 Referències

1. Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach.*, Ellis Horwood Limited: Chichester, 1988.
2. Companys, E. Speciation of heavy metals in macromolecular systems by electroanalytical techniques. Ph.D. Thesis. Universitat de Lleida (Spain), 2003.
3. Hughes, T. J. R. *The Finite Element Method*, Prentice Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1987.
4. Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F. Numerical procedures in electrochemical simulation. *Int. J. Quantum Chem.* **1994**, *51*, 357-367.
5. Galceran, J.; Gavaghan, D. J.; Rollett, J. S. 2-Dimensional Implementation of the Finite-Element Method with Singularity Correction for Diffusion-Limited Current at an Unshielded Disc Electrode. *J. Electroanal. Chem.* **1995**, *394*, 17-28.
6. Galceran, J.; Taylor, S. L.; Bartlett, P. N. Modelling the steady-state current at the inlaid disc microelectrode for homogeneous mediated enzyme catalysed reactions. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *506*, 65-81.
7. Puy, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Cecília, J.; Diaz-Cruz, M. S.; Esteban, M.; Mas, F. Voltammetry of labile metal macromolecular systems for any ligand-to-metal ratio, including adsorption phenomena - The role of the stability constant. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *374*, 223-234.
8. van Leeuwen, H. P.; Puy, J.; Galceran, J.; Cecília, J. Evaluation of the Koutecky-Koryta approximation for voltammetric currents generated by metal complex systems with various labilities. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *526*, 10-18.
9. Ames, W. F. *Numerical Methods for Partial Differential Equations*, Academic Press: New York, 1992.
10. Cecília, J. Simulació numèrica de processos electrodiodes en presencia d'adsorció. Ph.D. Thesis. UPC, 1995.
11. Galceran, J.; Rene, D.; Salvador, J.; Puy, J.; Esteban, M.; Mas, F. Reverse Pulse Polarography of labile metal + macromolecule systems with induced reactant adsorption - Theoretical analysis and determination of complexation and adsorption parameters. *J. Electroanal. Chem.* **1994**, *375*, 307-318.

# Capítol 6

Modelització de  
la Bioassimilació



## 6. Modelització de la bioassimilació

En el capítol 3 s'han descrit els principis bàsics que hi ha darrere els models teòrics habituals, i hom ha fet ressò de la manca de consideració de la difusió en els mateixos. També s'ha indicat la necessitat de disposar de models teòrics senzills, que tinguin en compte adequadament tots els processos bàsics implicats (difusió, adsorció i internalització) en la bioassimilació i l'acumulació de metalls per part de microorganismes, i que donin suport a les dades obtingudes en els assajos biològics en medis controlats, com per exemple, els que utilitzen microorganismes com a indicadors biològics de contaminació per metalls en medis naturals.

En aquest capítol partim de la modelització dels fenòmens bàsics implicats, corresponents a situacions àmpliament esteses en medis experimentals controlats, però fàcilment generalitzables, per elaborar un programa numèric de simulació que ens permeti obtenir els paràmetres i dades rellevants en qualsevol instant del procés, fins i tot, en etapes molt primerenques en les que no s'ha assolit encara el règim estacionari dels fluxos involucrats.

### 6.1 El cas d'una ruta metabòlica amb adsorció lineal.

#### 6.1.1 Descripció física del sistema

Pretenem simular la bioassimilació per part d'un organisme aquàtic (alga, fitoplàncton ...) que considerem esfèric, de radi  $r_0$ , d'una espècie química M que tant pot ser un nutrient com un metall contaminant, considerant exclusivament els fenòmens de transport per difusió, d'adsorció de M sobre la superfície de l'organisme i el procés cinètic de la internalització. En esquema, la descripció física del procés pot observar-se a la figura 1.

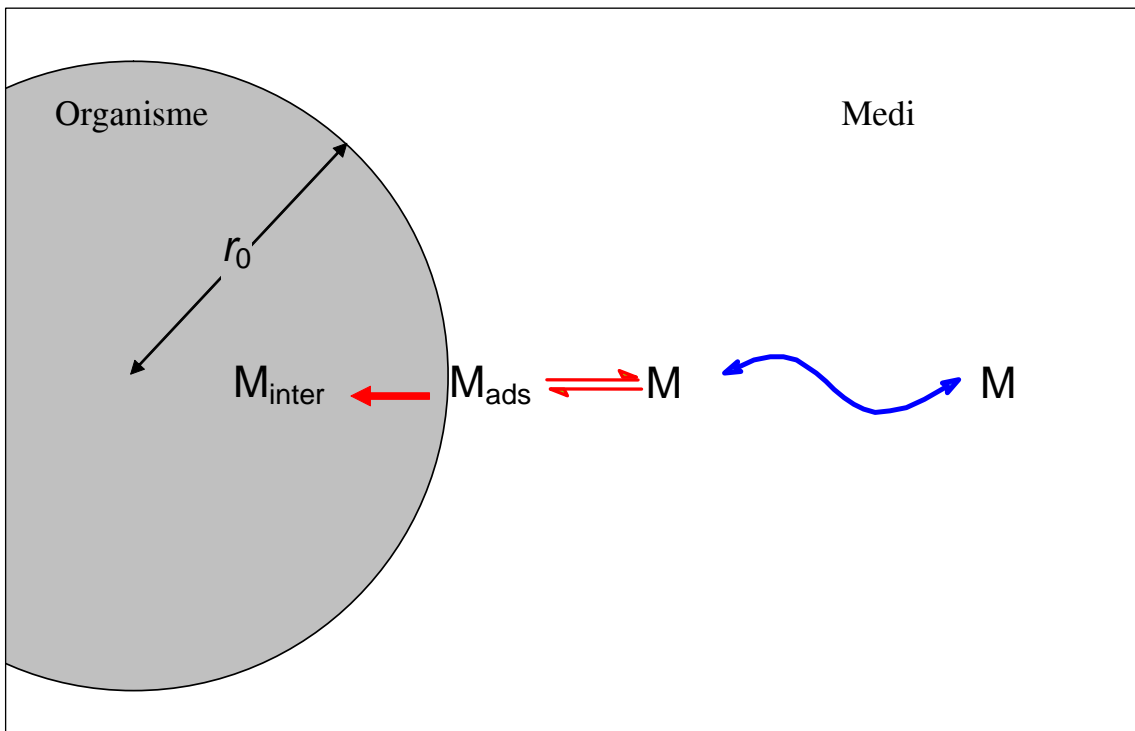


Figura 6.1 Esquema del mecanisme de la bioassimilació que es modela

### 6.1.2 Formulació matemàtica

En coordenades polars l'equació de difusió s'escriu

$$\frac{\partial c_M(r,t)}{\partial t} = D_M \left( \frac{\partial^2 c_M(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_M(r,t)}{\partial r} \right) \quad (6.1)$$

amb la condició inicial:

$$c_M(r,0) = c_M^* \quad (6.2)$$

i de difusió semi-infinita:

$$\lim_{r \rightarrow \infty} c_M(r,t) = c_M^* \quad \forall t \quad (6.3)$$

Fent el canvi de variables:

$$v(r,t) = r \cdot c_M(r,t) \quad (6.4)$$



les equacions (6.1), (6.2) i (6.3) es transformen en:

$$\frac{\partial v(r,t)}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 v(r,t)}{\partial r^2} \quad , \quad (6.5)$$

$$v(r,0) = r \cdot c_M^* \quad , \quad (6.6)$$

i

$$\lim_{r \rightarrow \infty} \frac{v(r,t)}{r} = c_M^* \quad \forall t \quad . \quad (6.7)$$

Apliquem la transformació de Laplace a l'equació (6.5) i queda:

$$D_M \frac{d^2 \bar{v}(r,s)}{d r^2} = s \bar{v}(r,s) - r c_M^* \quad (6.8)$$

on  $\bar{v}(r,s)$  és la Transformada de Laplace de la variable  $v(r,t)$ .

La solució (en l'espai transformat) de l'equació diferencial (6.8) és:

$$\bar{v}(r,s) = \frac{c_M^* r}{s} + A(s) e^{\sqrt{\frac{s}{D_M}} r} + B(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_M}} r} \quad , \quad (6.9)$$

on  $A(s)$  i  $B(s)$  són funcions a determinar a partir de les condicions del problema.

La condició de difusió semiinfinita exigeix un valor finit de  $\bar{v}(r,s)$  quan  $r \rightarrow \infty$ , i per tant  $A(s) = 0$ . Per trobar el valor de  $B(s)$  derivem l'equació (6.9) respecte de la variable  $r$

:

$$\frac{d \bar{v}(r,s)}{d r} = \frac{c_M^*}{s} - \sqrt{\frac{s}{D_M}} B(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_M}} r} \quad (6.10)$$

que per  $r = r_0$  queda:

$$\left( \frac{d \bar{v}(r,s)}{d r} \right)_{r=r_0} = \frac{c_M^*}{s} - \sqrt{\frac{s}{D_M}} B(s) e^{-\sqrt{\frac{s}{D_M}} r_0} \quad . \quad (6.11)$$

Eliminant  $B(s)$  entre (6.9) i (6.11) obtenim

$$\left( \frac{d \bar{v}(r,s)}{d r} \right)_{r=r_0} = \frac{c_M^*}{s} - \left[ \bar{v}(r_0,s) - \frac{c_M^* r_0}{s} \right] \sqrt{\frac{s}{D_M}} \quad ,$$

que dividint per  $s$  i destransformant ens porta a:

$$\boxed{\int_0^t \left( \frac{\partial v(r, \tau)}{\partial r} \right)_{r=r_0} d\tau = c_M^* \cdot t - \frac{1}{\sqrt{\pi D_M}} \int_0^t \frac{v(r_0, t) - c_M^* \cdot r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau} \quad (6.12)$$

aplicable a qualsevol espècie no complexada que es difon en geometria esfèrica amb condicions de difusió semi-infinita, independentment de les condicions de contorn a  $r=r_0$ .

### 6.1.2.1 Adsorció lineal

Suposem una ràpida adsorció lineal (regida per la isoterma de Henry i el paràmetre  $K_H$ )

$$\Gamma(t) = K_H \cdot c_M(0, t) \quad , \quad (6.13)$$

seguida d'un procés d'internalització irreversible que segueix una cinètica de primer ordre amb constant  $k_{\text{int}}$ . El balanç de fluxos de M a la superfície de l'organisme ens forneix la condició de contorn

$$\frac{d\Gamma(t)}{dt} = D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - k_{\text{int}} \cdot \Gamma(t) \quad (6.14)$$

que es pot reescriure com:

$$K_H \frac{\partial c_M(r_0, t)}{\partial t} = D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - k_{\text{int}} \cdot K_H \cdot c_M(r_0, t) \quad . \quad (6.15)$$

En termes de la variable  $v(r, t)$  definida en (6.4), l'equació anterior queda:

$$\frac{K_H}{r_0} \frac{\partial v(r_0, t)}{\partial t} = D_M \left[ \frac{1}{r} \left( \frac{\partial v(r, t)}{\partial r} \right) - \frac{v(r, t)}{r^2} \right]_{r=r_0} - \frac{k_{\text{int}} \cdot K_H}{r_0} v(r_0, t) \quad , \quad (6.16)$$

o bé,

$$\frac{\partial v(r_0, t)}{\partial t} = \frac{D_M}{K_H} \left( \frac{\partial v(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) v(r_0, t) \quad . \quad (6.17)$$

Aquesta és la condició de contorn a la superfície per a l'equació diferencial general que volem resoldre (6.5).

### 6.1.2.1.1 Estat Estacionari

Per al cas particular d'estat estacionari, l'equació (6.5) esdevé

$$\frac{\partial^2 v(r, t)}{\partial r^2} = 0 \quad (6.18)$$

que, considerant la difusió seminfinita, té per solució:

$$v(r) = (r - r_0) c_M^* + r_0 c_M(r_0) = r c_M^* + r_0 [c_M(r_0) - c_M^*] \quad (6.19)$$

Aleshores

$$\left( \frac{\partial v(r)}{\partial r} \right)_{r=r_0} = c_M^* \quad (6.20)$$

i, per tant,

$$\left( \frac{\partial c_M(r)}{\partial r} \right)_{r=r_0}^{SS} = \frac{c_M^* - c_M(r_0)}{r_0} \quad (6.21)$$

que indica un gradient equivalent a una variació des del valor de la concentració al si de la solució fins a  $c_M(r_0)$  en tot just una distància  $r_0$ .

Combinant aquesta equació (6.21) amb (6.15) queda:

$$0 = D_M \left( \frac{c_M^* - c_M(r_0)}{r_0} \right) - k_{\text{int}} \cdot K_H \cdot c_M(r_0), \quad (6.22)$$

que ens dóna una expressió per la concentració de metall a l'origen, en l'estat estacionari:

$$c_M^{SS}(r_0) = \frac{c_M^*}{1 + \frac{k_{\text{int}} K_H r_0}{D_M}} \quad (6.23)$$

i substituint en (6.21), una altra pel gradient:

$$\left( \frac{\partial c_M(r)}{\partial r} \right)_{r=r_0}^{SS} = \frac{c_M^*}{r_0 \left( \frac{D_M}{k_{\text{int}} K_H r_0} + 1 \right)} = \frac{c_M^*}{\frac{D_M}{k_{\text{int}} K_H} + r_0} \quad (6.24)$$

### 6.1.2.1.2 L'estat transitori

#### Ressolució Analítica

El sistema considerat (equació (6.17)), amb condicions de difusió semi-infinita, té una solució analítica (1,2). Efectivament, en (3), es descriu una expressió analítica per la concentració de M a la superfície de l'organisme la qual es pot escriure en funció de dos paràmetres auxiliars  $\alpha$  i  $\beta$ , definits com:

$$\alpha \equiv \frac{\sqrt{D_M r_0} + \sqrt{D_M r_0 - 4(D_M K_H + k_{int} K_H^2 r_0)}}{2K_H \sqrt{r_0}} \quad (6.25)$$

i

$$\beta \equiv \frac{\sqrt{D_M r_0} - \sqrt{D_M r_0 - 4(D_M K_H + k_{int} K_H^2 r_0)}}{2K_H \sqrt{r_0}} \quad (6.26)$$

Poden distingir-se dues situacions segons els valors que prenen  $\alpha$  i  $\beta$ . En el cas que  $\alpha \neq \beta$ , la concentració de M a la superfície de l'organisme pot expressar-se com:

$$c_M(r_0, t) = c_M^{SS} + c_M^* \left[ \frac{\beta(D_M - \alpha r_0 \sqrt{D_M}) F(\alpha \sqrt{t}) + \alpha(\beta r_0 \sqrt{D_M} - D_M) F(\beta \sqrt{t})}{\alpha \beta (\alpha - \beta) K_H r_0} \right], \quad (6.27)$$

$\alpha \neq \beta$

on  $c_M^{SS}$  ve determinat pel valor donat per (6.23).

Quan  $\alpha = \beta$ , tenim:

$$c_M(r_0, t) = \frac{c_M^* D_M \left( \frac{2\sqrt{t}}{\sqrt{D_M \pi}} - \frac{t}{K_H} F\left(\frac{\sqrt{D_M t}}{2K_H}\right) \right)}{K_H} + \frac{4c_M^* K_H \left[ 1 - \frac{\sqrt{D_M t}}{K_H \sqrt{\pi}} + \left( \frac{D_M t}{2K_H^2} - 1 \right) F\left(\frac{\sqrt{D_M t}}{2K_H}\right) \right]}{r_0} \quad (6.28)$$

on

$$F(x) \equiv e^{-x^2} \operatorname{erfc}(x). \quad (6.29)$$

### Aproximació numèrica

Posteriorment al cas que hem descrit en l'apartat previ, analitzarem sistemes en condicions de major complexitat (diferents tipus de setis d'adsorció i internalització, isoterma de Langmuir, ..) pels quals hem hagut de desenvolupar estratègies numèriques de resolució. Aquestes metodologies les hem aplicat al sistema actual, del que ja coneixem les solucions analítiques, per comprovar-ne l'eficàcia i contrastar els resultats. Procedim com segueix.

Integrant l'equació (6.17):

$$\int_0^t \left( \frac{\partial v(r_0, t)}{\partial t} \right) d\tau = \frac{D_M}{K_H} \int_0^t \left( \frac{\partial v(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} d\tau - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) \int_0^t v(r_0, t) d\tau \quad (6.30)$$

i fent servir la integral del flux (6.12), obtenim:

$$v(r_0, t) = \frac{D_M c_M^* t}{K_H} - \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} \int_0^t \frac{v(\tau) - c_M^* r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) \int_0^t v(r_0, t) d\tau . \quad (6.31)$$

Reescrivim l'equació anterior i reagrupem termes en funció de les integrals que apareixen:

$$v(r_0, t) = \frac{D_M c_M^* t}{K_H} - \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} \left( \int_0^t \frac{v(\tau)}{\sqrt{t - \tau}} d\tau - c_M^* r_0 \int_0^t \frac{d\tau}{\sqrt{t - \tau}} \right) - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) \int_0^t v(r_0, t) d\tau . \quad (6.32)$$

La segona de les integrals d'aquesta equació es resol fent el canvi de variables  $z = t - \tau$ ,

que comporta  $\int_0^t \frac{d\tau}{\sqrt{t - \tau}} = 2\sqrt{t}$ , i ens deixa l'equació (6.32) com:

$$v(r_0, t) = \frac{D_M c_M^* t}{K_H} + \frac{2c_M^* r_0}{K_H} \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \sqrt{t} - \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} \int_0^t \frac{v(\tau)}{\sqrt{t - \tau}} d\tau - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) \int_0^t v(r_0, t) d\tau \quad (6.33)$$

Les dues integrals restants les calculem aplicant el mètode de Huber (4) que estableix que una integral com la del membre de l'esquerra de l'equació (6.34) es pot substituir per una suma com la del membre de la dreta, estesa als intervals de l'engraellat en el que es discretitza l'interval temporal de la integral.:

$$\int_{T_1}^t \frac{F(\phi(\tau), \tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \approx \sum_{k=0}^M w_{kM} F(\phi(t_k), t_k) \quad , \quad (6.34)$$

$$F(\phi(t_k), t_k) = F^+(\phi(t_0), t_0) \cdot N_0^+(t_0) + \sum_{k=1}^{M-1} [F^-(\phi(t_k), t_k) \cdot N_k^-(t_k) + F^+(\phi(t_k), t_k) \cdot N_k^+(t_k)] + \\ + F^-(\phi(t_M), t_M) \cdot N_M^-(t_M) \quad (6.35)$$

on  $F^-$  i  $F^+$  corresponen al valor que pren la funció per l'esquerra i la dreta, respectivament, en cada punt de l'engraellat corresponent en que discretitzem l'interval temporal de la integració,  $w_{kM}$ , els pesos corresponents (amb una expressió diferent segons la forma de la integral), i els valors de  $N^-$  i  $N^+$  corresponen als valors d'una base d'interpoladors lineals que, en aquest mètode, hem escollit com:

$$N_k^-(t) = \begin{cases} \frac{t-t_{k-1}}{t_k-t_{k-1}} & \text{si } t \in [t_{k-1}, t_k] \\ 0 & \text{en cas contrari} \end{cases} \quad (6.36)$$

**i**

$$N_k^+(t) = \begin{cases} \frac{t_{k+1}-t}{t_{k+1}-t_k} & \text{si } t \in [t_k, t_{k+1}] \\ 0 & \text{en cas contrari} \end{cases} \quad (6.37)$$

Bategem els pesos corresponents de les integrals de (6.33) com NL (per no lineal) els de la primera integral i com L (per lineal) els de la segona:

$$w_{kM}^{NL\pm} = \int_{T_1}^M \frac{N_k^\pm(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (6.38)$$

**i**

$$w_{kM}^{L\pm} = \int_{T_1}^M N_k^\pm(\tau) d\tau \quad (6.39)$$

Aquestes integracions en cada fragment considerat de la graella de punts, tenint en compte les definicions (6.36) i (6.37), ens porten a :

$$\begin{aligned}
 w_{kM}^{NL-} &= \frac{1}{t_k - t_{k-1}} \left[ \frac{4}{3} (t_M - t_{k+1})^{3/2} - 2 (t_M - t_{k+1})(t_M - t_k)^{1/2} + \frac{2}{3} (t_M - t_k)^{3/2} \right] \\
 w_{kM}^{NL+} &= \frac{1}{t_{k+1} - t_k} \left[ \frac{4}{3} (t_M - t_{k-1})^{3/2} - 2 (t_M - t_{k-1})(t_M - t_k)^{1/2} + \frac{2}{3} (t_M - t_k)^{3/2} \right]
 \end{aligned} \tag{6.40}$$

**i**

$$\begin{aligned}
 w_{kM}^{L-} &= \frac{1}{2} (t_k - t_{k-1}) \\
 w_{kM}^{L+} &= \frac{1}{2} (t_{k+1} - t_k)
 \end{aligned} \tag{6.41}$$

Evidentment si la discretització temporal s'escull amb pas constant, aquestes expressions són simplificables en funció del pas, però preferim aquí mantenir aquestes expressions per no perdre generalitat.

En substituir les integrals de (6.33) pels sumatoris (6.35), i engraellant l'interval d'integració 0-M, ens queda

$$\begin{aligned}
 v(M) &= \frac{D_M c_M^*}{K_H} t_M + \frac{2c_M^* r_0}{K_H} \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \sqrt{t_M} - \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} \left[ \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{NL-} - w_{kM}^{NL+}) v(k) \right] - \\
 &\quad - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) \left[ \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{L-} - w_{kM}^{L+}) v(k) \right] - \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} w_{MM}^{NL-} v(M) - \\
 &\quad - \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) w_{MM}^{L-} v(M)
 \end{aligned} \tag{6.42}$$

on hem suposat continuïtat de la funció  $v(k)$  en cada node de l'engraellat, i que  $v(0) = 0$ .

M, en l'expressió anterior correspon al darrer punt de l'engraellat temporal i, per tant,  $v(M)$  correspon, físicament al que hàviem descrit com  $v(r_0, t_d)$ .

Reordenant l'expressió anterior i aïllant obtenim:

$$\begin{aligned}
 v(M) &= \\
 &= \frac{\frac{D_M c_M^*}{K_H} t_M + \frac{2c_M^* r_0}{K_H} \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \sqrt{t_M} - \sum_{k=1}^{M-1} \left\{ \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} (w_{kM}^{NL-} + w_{kM}^{NL+}) + \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) (w_{kM}^{L-} + w_{kM}^{L+}) \right\} v(k)}{1 + \frac{\sqrt{D_M}}{K_H \sqrt{\pi}} w_{MM}^{NL-} + \left( \frac{D_M}{K_H r_0} + k_{\text{int}} \right) w_{MM}^{L-}}
 \end{aligned} \tag{6.43}$$

que ens permet determinar el valor de la funció  $v(M)$  en funció dels paràmetres del model i del seu valor en els instants previs. El càlcul del valor d'aquesta magnitud s'ha realitzat mitjançant un programa escrit en llenguatge FORTRAN, que té en compte aquests valors en els instants previs a  $t_d$ . L'aplicació de la relació (6.4) ens permet conèixer el valor de la concentració de metall a la superfície de l'organisme.

Els resultats obtinguts de forma analítica i els obtinguts amb el programa FORTRAN que usa l'aproximació numèrica, han demostrat un alt nivell de concordança en una gran diversitat de casos i condicions que s'han comparat.

## **6.2 El cas de dues rutes metabòliques amb adsorció langmuiriana**

### **6.2.1 Descripció física del sistema.**

Suposem ara que l'espècie M es difon cap a l'organisme, esfèric de radi  $r_0$ , des del si del medi, on es troba amb una concentració  $c_M^*$ . En la superfície del mateix existeixen dos tipus de setis en els que M s'adsorbeix seguint una isoterma de Langmuir, de constants  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$ , i des d'on s'internalitza seguint un procés cinètic de primer ordre en cada cas, amb constants cinètiques  $k_1$  i  $k_2$  respectivament. Gràficament, el procés es descriu segons la figura 2.



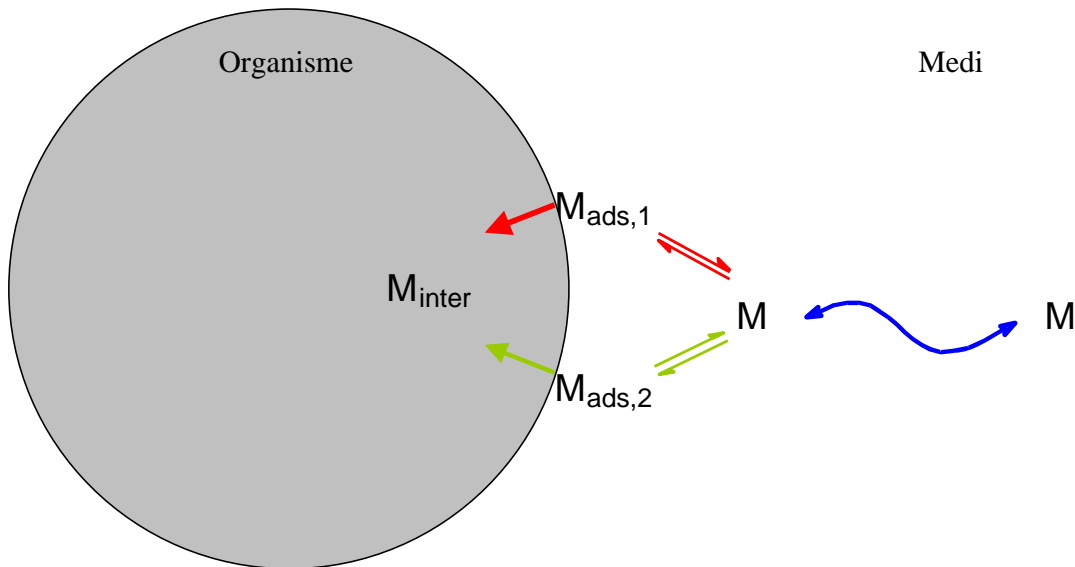


Figura 6.2 Esquema de la bioassimilació amb dues vies metabòliques

En el cas de dues rutes metabòliques, és a dir, dos tipus diferents de setis d'adsorció, poden distingir-se dues situacions diferents: aquella en la que els dos tipus de setis adsorbeixen i internalitzen (col·loquialment, dues boques) i aquella en la que només una de les dues internalitza metall cap a l'interior de l'organisme (boca-orella). El segon cas, analitzat també en les aplicacions pràctiques de la modelització, pot considerar-se un cas particular del primer, més general, en el que el valor de  $k_2$ , constant cinètica d'internalització del segon tipus de seti, val zero.

### 6.2.2 Formulació matemàtica

Matemàticament el sistema es pot descriure mitjançant les equacions que descriuen la difusió (equació (6.1)), amb les mateixes condicions inicial (equació (6.2)), i de difusió semiinfinita (equació (6.3)) que en el cas d'una ruta metabòlica descrit en l'apartat 1.2.

La condició de contorn corresponent al balanç de M a la superfície de l'organisme s'ha d'escriure ara com:

$$D_M \left( \frac{\partial c_M(r,t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} = \frac{d\Gamma_1(t)}{dt} + \frac{d\Gamma_2(t)}{dt} + k_1 \cdot \Gamma_1(t) + k_2 \cdot \Gamma_2(t) \quad (6.44)$$

S'ha considerat que la isoterma d'adsorció que segueixen els dos tipus de setis correspon al model de Langmuir, ja que preveu la possibilitat de saturació dels llocs, més d'acord amb les evidències experimentals, que l'adsorció lineal o isoterma de Henry que no preveu límit per la quantitat de metall adsorbida en cada seti específic.

Les quantitats de M adsorbides als setis de tipus 1 i 2 venen descrites per:

$$\begin{aligned}\Gamma_1(t) &= \Gamma_1^{\max} \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,1} + c_M(r_0, t)} \\ \Gamma_2(t) &= \Gamma_2^{\max} \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,2} + c_M(r_0, t)}\end{aligned}\quad (6.45)$$

A efectes pràctics, ens interessa trobar com a funció resposta, el valor de  $c_M(r_0, t)$ , i els valors dels fluxos de transport de massa,  $J_m(t)$  i d'internalització,  $J_u(t)$ , definits com:

$$J_m(t) = D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} \quad (6.46)$$

i

$$J_u(t) = k_1 \Gamma_1(t) + k_2 \Gamma_2(t). \quad (6.47)$$

La manca de linealitat en les equacions que deriven de la descripció física del problema fa que no es pugui trobar una solució analítica i s'hagi de plantejar una resolució numèrica, en la línia de la que s'ha plantejat en l'apartat 6.1.2.1.2 anterior.

### 6.2.2.1 Estat estacionari

En l'estat estacionari, els termes de l'equació (6.44) que presenten variació amb el temps s'anul·len, i aquesta situació posa de manifest una igualtat dels fluxos difusius i els de internalització:  $J_m(t) = J_u(t)$ . Això es pot descriure com:

$$D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} = k_1 \cdot \Gamma_1(t) + k_2 \cdot \Gamma_2(t) \quad (6.48)$$

Cal resoldre l'equació (6.18) considerant la difusió semiinfinita. Resulta d'aplicació l'equació (6.21) que ens permet escriure l'expressió anterior com:

$$D_M \frac{c_M^* - c_M^{SS}}{r_0} = k_1 \Gamma_1^{\max} \frac{c_M^{SS}}{K_{M,1} + c_M^{SS}} + k_2 \Gamma_2^{\max} \frac{c_M^{SS}}{K_{M,2} + c_M^{SS}}, \quad (6.49)$$

on  $c_M^{SS}$  indica la concentració de l'espècie M a la superfície de l'organisme en un règim estacionari.

En l'expressió anterior s'igualen una expressió lineal i amb la suma de dues hipèrboles (respecte la variable  $c_M^{SS}$ ). Aquest fet permet usar una metodologia gràfica per obtenir el valor de  $c_M^{SS}$  i analitzar la seva dependència respecte de diversos paràmetres del sistema.

Efectivament, si representem gràficament el flux difusiu  $J_m$ , i el flux d'internalització o d'assimilació,  $J_u$ , en front la variable  $c_M(r_0)$ , tal com es veu en la figura 3, els punts de tall de la recta corresponent a  $J_m^{SS}$  amb  $J_u^{SS}$  (suma de les dues hipèrboles de  $J_u^{SS}$ ), corresponen a les solucions del problema. Dos d'aquests punts de tall, tal com s'observa en la figura 3, han de correspondre a punts en els que  $c_M(r_0)$  és menor que el valor corresponent al de les asímptotes verticals  $c_M(r_0) = -K_{M,1}$ , i  $c_M(r_0) = -K_{M,2}$ , negatius, per tant. En el tercer punt de tall en canvi, l'únic amb significat físic, el valor de  $c_M(r_0)$  ha de ser necessàriament positiu ja que quan, per exemple, el segon membre de l'equació (6.49),  $J_u$ , val zero, (voldria dir que  $c_M(r_0) = 0$ ), el primer membre és encara positiu ( $D_M \frac{c_M^*}{r_0}$ ). Donat el pendent negatiu de la recta del primer membre, el punt de tall s'ha de produir cap a valors més a la dreta de l'origen de coordenades, en l'interval entre  $c_M(r_0) = 0$  i quan  $J_m = 0$ , és a dir, quan  $c_M(r_0) = c_M^*$ .

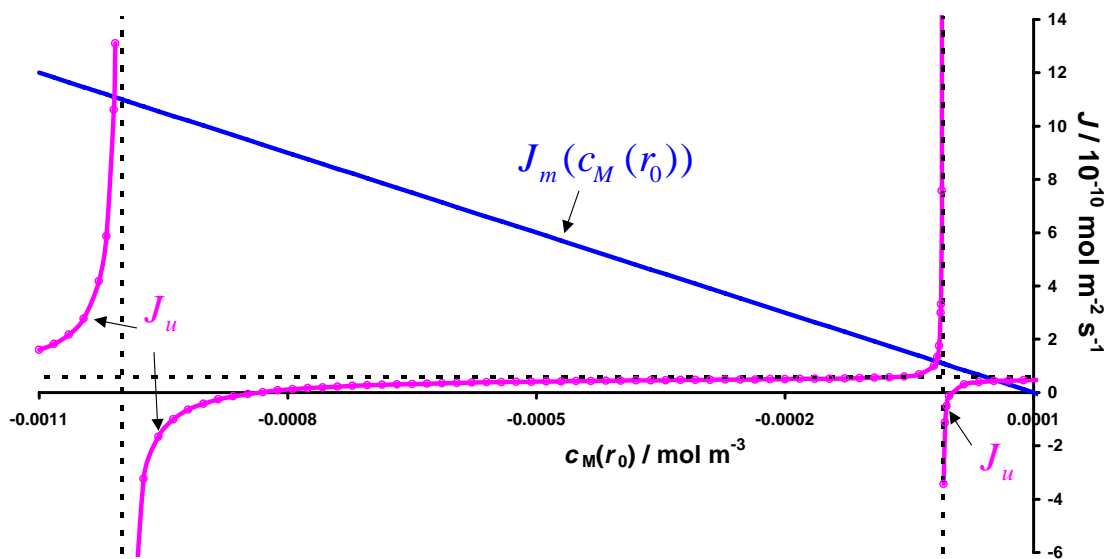


Figura 6.3 : Esquema gràfic de determinació de  $c_M^{SS}$

Aquest procediment gràfic permet comprendre i avaluar de forma senzilla l'impacte que els diferents paràmetres, com ara  $D_M$ ,  $r_0$  o  $\Gamma_{\max}$ , poden tenir sobre la concentració de M a la superfície de l'organisme en l'estat estacionari. En les gràfica 4, on per simplicitat només s'ha representat el quadrant corresponent als semieixos positius de la representació anterior, pot observar-se aquesta metodologia (3), en l'efecte que té la variació de  $r_0$ , per exemple, sobre el valor de  $c_M^{SS}$ .

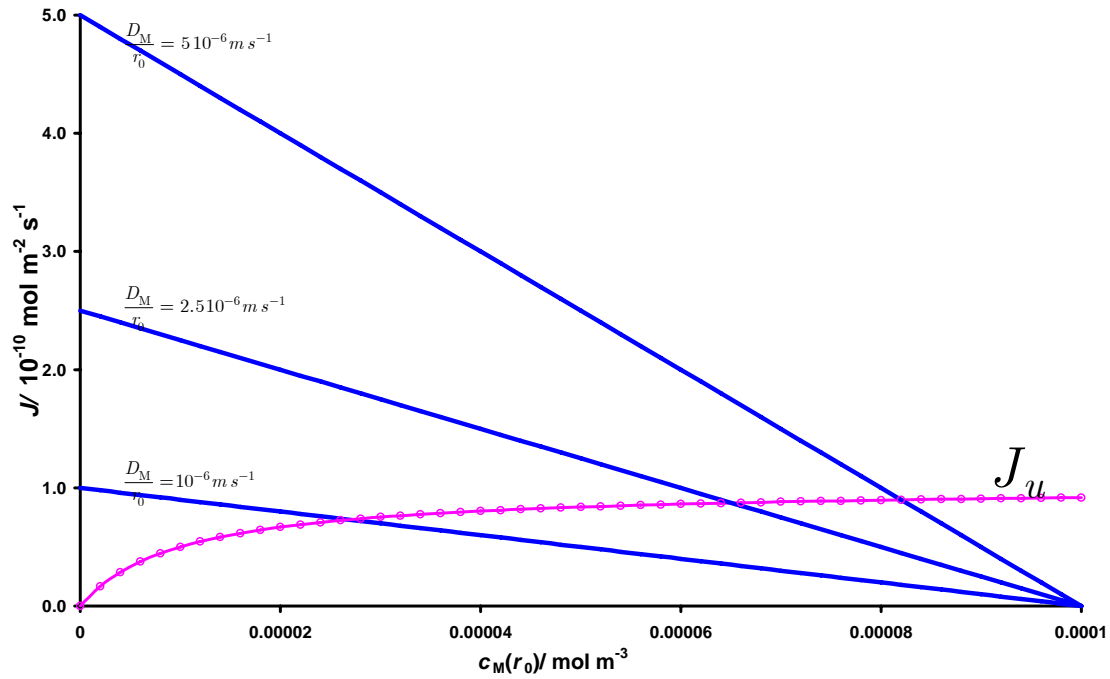


Figura 6.4 : Esquema gràfic de la determinació de l'impacte de  $r_0$  sobre el valor de  $c_M^{SS}$

### 6.2.2.2 L'estat transitori

Integrant l'equació (6.44) respecte del temps ens queda:

$$\Gamma_1(t) + \Gamma_2(t) = \int_0^t D_M \left( \frac{\partial c_M(r, \tau)}{\partial r} \right)_{r=r_0} d\tau - \int_0^t [k_1 \Gamma_1(\tau) + k_2 \Gamma_2(\tau)] d\tau, \quad (6.50)$$

que amb el canvi de variables indicat per l'equació (6.4) porta a:

$$\Gamma_1(t) + \Gamma_2(t) = \int_0^t \left\{ D_M \frac{1}{r} \left( \frac{\partial v(r, \tau)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - D_M \frac{v(r_0, \tau)}{r_0^2} \right\} d\tau - \int_0^t [k_1 \Gamma_1(\tau) + k_2 \Gamma_2(\tau)] d\tau \quad (6.51)$$

Aplicant la integral de flux (6.12) tenim:

$$\Gamma_1(t) + \Gamma_2(t) = \frac{D_M}{r_0} \left\{ c_M^* t - \frac{1}{\sqrt{\pi D_M}} \int_0^t \frac{v(r_0, \tau) - c_M^* r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau \right\} - \int_0^t \left\{ k_1 \Gamma_1(\tau) + k_2 \Gamma_2(\tau) + \frac{D_M}{r_0} v(r_0, \tau) \right\} d\tau \quad (6.52)$$

Quan substituïm les expressions de  $\Gamma_1(t)$  i  $\Gamma_2(t)$  pels seus valors (6.45) ens queda :

$$\Gamma_1^{\max} \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,1} + v(r_0, \tau)} + \Gamma_2^{\max} \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,2} + v(r_0, \tau)} = \frac{D_M}{r_0} \left\{ c_M^* t - \frac{1}{\sqrt{D_M \pi}} \int_0^t \frac{v(r_0, \tau) - c_M^* r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau \right\} - \int_0^t \left\{ k_1 \Gamma_1^{\max} \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,1} + v(r_0, \tau)} + k_2 \Gamma_2^{\max} \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,2} + v(r_0, \tau)} + \frac{D_M}{r_0^2} v(r_0, \tau) \right\} d\tau \quad (6.53)$$

Les integrals de l'equació anterior les resolem numèricament: la primera,

$$\int_0^t \frac{v(r_0, \tau) - c_M^* r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau, \text{ i la quarta, } \int_0^t v(r_0, \tau) d\tau, \text{ aplicant el mètode de Huber, tal com hem}$$

fet en el cas de l'equació (6.31), i la segona i la tercera,  $\int_0^t \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,i} + v(r_0, \tau)} d\tau$ , pel mètode

numèric dels trapezidis.

#### 6.2.2.2.2.1 Resolució de les integrals de l'equació (6.53)

La primera de les integrals, tal com hem vist a partir de (6.34) pot escriure's en funció

de  $w^{\text{NL}}$  i  $w^{\text{L}}$  donades per les equacions (6.40) i (6.41) i dóna:

$$\int_0^t \frac{v(r_0, \tau) - c_M^* r_0}{\sqrt{t - \tau}} d\tau = \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{\text{NL}-} + w_{kM}^{\text{NL}+}) v(t_k) + w_{MM}^{\text{NL}-} v(t_M) - 2c_M^* r_0 \sqrt{t_M}, \quad (6.54)$$

essent la segona:

$$\int_0^t v(r_0, \tau) d\tau = \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{\text{L}-} + w_{kM}^{\text{L}+}) v(t_k) + w_{MM}^{\text{L}-} v(t_M). \quad (6.55)$$

La tercera, aplicant el mètode dels trapezidis s'escriu:

$$\int_0^t \frac{v(r_0, \tau)}{r_0 K_{M,i} + v(r_0, \tau)} d\tau = \sum_{k=1}^{M-1} \left( \frac{v(t_k)}{r_0 K_{M,i} + v(t_k)} + \frac{v(t_{k-1})}{r_0 K_{M,i} + v(t_{k-1})} \right) \frac{t_k - t_{k-1}}{2} + \left( \frac{v(t_M)}{r_0 K_{M,i} + v(t_M)} + \frac{v(t_{M-1})}{r_0 K_{M,i} + v(t_{M-1})} \right) \frac{t_M - t_{M-1}}{2}. \quad (6.56)$$

Substituint el valor d'aquestes integrals en (6.53), reordenant i agrupant termes ens queda l'equació cúbica en la incògnita  $v(t_M)$  ( que també designem abreujadament per  $v(M)$ , tal com havíem dit abans):

$$\begin{aligned}
 & \left[ \frac{D_M}{\pi} \frac{w_{MM}^{NL-}}{r_0} + \frac{D_M}{r_0^2} w_{MM}^{L-} \right] v^3(t_M) + \\
 & \left[ \Gamma_1^{\max} + \Gamma_2^{\max} - \frac{D_M}{r_0} c_M^* t_M + \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \frac{1}{r_0} \left\{ \text{SUMA1} - 2c_M^* r_0 \sqrt{t_M} + (\alpha_1 + \alpha_2) w_{MM}^{NL-} \right\} + \right. \\
 & + \frac{D_M}{r_0^2} \left\{ \text{SUMA2} + (\alpha_1 + \alpha_2) w_{MM}^{L-} \right\} + k_1 \Gamma_1^{\max} \left\{ \text{SUMA3} + \left( \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_1 + v(t_{M-1})} + 1 \right) \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} + \\
 & \left. + k_2 \Gamma_2^{\max} \left\{ \text{SUMA4} + \left( \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_2 + v(t_{M-1})} + 1 \right) \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} \right] v^2(t_M) + \\
 & \left[ \Gamma_1^{\max} \alpha_2 + \Gamma_2^{\max} \alpha_1 - \frac{D_M}{r_0} c_M^* (\alpha_1 + \alpha_2) + \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \frac{1}{r_0} \left\{ \text{SUMA1} (\alpha_1 + \alpha_2) - 2c_M^* r_0 \sqrt{t_M} \alpha_1 \alpha_2 + \alpha_1 \alpha_2 w_{MM}^{NL-} \right\} + \right. \\
 & + \frac{D_M}{r_0^2} \left\{ \text{SUMA2} (\alpha_1 + \alpha_2) + \alpha_1 \alpha_2 w_{MM}^{L-} \right\} + \\
 & + k_1 \Gamma_1^{\max} \left\{ (\alpha_1 + \alpha_2) \left[ \text{SUMA3} + \left( \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_2 + v(t_{M-1})} + 1 \right) \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right] + \alpha_2 \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} + \\
 & + k_2 \Gamma_2^{\max} \left\{ (\alpha_1 + \alpha_2) \left[ \text{SUMA4} + \left( \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_2 + v(t_{M-1})} + 1 \right) \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right] + \alpha_1 \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} \right] v(t_M) + \\
 & + \alpha_1 \alpha_2 \left[ -\frac{D_M}{r_0} c_M^* t_M + \sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \frac{1}{r_0} \left\{ \text{SUMA1} - 2c_M^* r_0 \sqrt{t_M} \right\} + \frac{D_M}{r_0^2} \text{SUMA2} + \right. \\
 & \left. + k_1 \Gamma_1^{\max} \left\{ \text{SUMA3} + \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_1 + v(t_{M-1})} \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} + k_2 \Gamma_2^{\max} \left\{ \text{SUMA4} + \frac{v(t_{M-1})}{\alpha_2 + v(t_{M-1})} \frac{t_M - t_{M-1}}{2} \right\} \right] = 0
 \end{aligned} \tag{6.57}$$

on s'ha remarcat en vermell la variable incògnita del nostre sistema, i s'han introduït les definicions següents:

$$\alpha_i \equiv r_0 K_{M,i}, \tag{6.58}$$

$$\text{SUMA1} \equiv \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{NL-} + w_{kM}^{NL+}) v(t_k), \tag{6.59}$$

$$\text{SUMA2} \equiv \sum_{k=1}^{M-1} (w_{kM}^{L-} + w_{kM}^{L+}) v(t_k), \tag{6.60}$$

$$\text{SUMA3} \equiv \sum_{k=1}^{M-1} \left( \frac{v(t_k)}{\alpha_1 + v(t_k)} + \frac{v(t_{k-1})}{\alpha_1 + v(t_{k-1})} \right) \frac{t_k - t_{k-1}}{2}, \tag{6.61}$$

$$\text{SUMA4} \equiv \sum_{k=1}^{M-1} \left( \frac{v(t_k)}{\alpha_2 + v(t_k)} + \frac{v(t_{k-1})}{\alpha_2 + v(t_{k-1})} \right) \frac{t_k - t_{k-1}}{2} \quad (6.62)$$

Aquestes sumes són fàcils de programar i calcular de forma automatitzada per cada pas de temps de l'engraellat i trobar la funció resposta en el temps que ens interessa.

### 6.2.2.3 El límit d'adsorció lineal

En el cas d'un recobriment baix ( $c_M(r_0, t) = K_{M,i}$ ), les isoterms (6.45) es poden aproximar com :

$$\begin{aligned} \frac{\Gamma_1(t)}{\Gamma_1^{\max}} &\approx \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,1}} \\ \frac{\Gamma_2(t)}{\Gamma_2^{\max}} &\approx \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,2}} \end{aligned} \quad (6.63)$$

i l'equació (6.44) es pot reescriure com:

$$\begin{aligned} \left( \frac{\Gamma_1^{\max}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_2^{\max}}{K_{M,2}} \right) \frac{d c_M(r_0, t)}{d t} = \\ = D_M \left( \frac{\partial c_M(r_0, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - \left( \frac{k_1 \Gamma_1^{\max} K_{M,2} + k_2 \Gamma_2^{\max} K_{M,1}}{\Gamma_1^{\max} K_{M,2} + \Gamma_2^{\max} K_{M,1}} \right) \cdot \left( \frac{\Gamma_1^{\max}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_2^{\max}}{K_{M,2}} \right) c_M(r_0, t) \end{aligned} \quad (6.64)$$

Això és, el nostre problema de “dues boques” s'ha reduït a un problema lineal “d'una sola boca” amb uns valors efectius dels paràmetres:

$$K_{H,\text{equiv}} = \left( \frac{\Gamma_1^{\max}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_2^{\max}}{K_{M,2}} \right) \quad (6.65)$$

i

$$k_{\text{int},\text{equiv}} = \left( \frac{k_1 \Gamma_1^{\max} K_{M,2} + k_2 \Gamma_2^{\max} K_{M,1}}{\Gamma_1^{\max} K_{M,2} + \Gamma_2^{\max} K_{M,1}} \right) \quad (6.66)$$

és a dir, de manera similar a l'equació (6.15), :

$$K_{H,\text{equiv}} \frac{d c_M(r_0, t)}{d t} = D_M \left( \frac{\partial c_M(r_0, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - k_{\text{int},\text{equiv}} K_{H,\text{equiv}} \cdot c_M(r_0, t) \quad (6.67)$$



Es pot demostrar que, en el cas de més de dos tipus de setis d'adsorció i internalització sobre la superfícies de l'organisme, en el cas del límit lineal, el sistema es pot descriure com si només hi hagués present un sol tipus de lloc amb isoterma d'adsorció lineal i paràmetres característics donats per:

$$K_{H,\text{equiv}} = \sum_i \frac{\Gamma_i^{\text{max}}}{K_{M,i}} \quad (6.68)$$

i

$$k_{\text{int,equiv}} = \frac{\sum_i \frac{k_i \Gamma_i^{\text{max}}}{K_{M,i}}}{\sum_i \frac{\Gamma_i^{\text{max}}}{K_{M,i}}} \quad (6.69)$$

### 6.3 Referències

1. Holub, K. Surface reaction of an adsorbed substance transported by diffusion to a spherical electrode. *Collect.Czech.Chem.Commun.* **1966**, *31*, 1655-1665.
2. Holub, K.; van Leeuwen, H. P. Influence of reactant adsorption on limiting currents in normal pulse polarography .2. Theory for the stationary, spherical electrode. *J.Electroanal.Chem.* **1984**, *162*, 55-65.
3. Galceran, J.; van Leeuwen, H. P. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester (UK), 2004; pp 147-203.
4. Huber, A. *Monatshefte Fur Chemie* **1939**, *47*, 240-



# Capítol 7

Modelització dels

Corrents en Canals Iònics



## **7. Modelització del canals iònics.**

### **7.1 Introducció**

El plantejament que s'ha seguit en la interpretació i modelització dels corrents obtinguts pel flux d'ions a través de canals iònics sobre capes monolipídiques ha estat substancialment diferent del que s'havia fet en els apartats descrits en els capítols anteriors. En aquelles ocasions es partia d'una selecció de fenòmens físics que eren els que es consideraven rellevants per a la descripció i interpretació del procés, es reescriuen en termes matemàtics i s'obtenien un conjunt d'equacions que, resoltes de forma analítica o numèrica, permetien obtenir el valor de la funció escollida com a resposta.

En aquest cas, pretenem analitzar uns corrents obtinguts de manera experimental per obtenir uns valors de paràmetres del sistema que ens permetin, a partir de la metodologia emprada en la realització de l'experiment, obtenir dades indicatives de quins són els mecanismes físics que han intervingut en el procés. A partir d'ells, intentarem modelitzar-los de forma similar a com ho fèiem en els apartats anteriors, obtenint així, uns corrents simulats com a funció resposta. La comparació d'aquesta amb els valors experimentals ha de servir de test de la bondat del mètode.

El nostre sistema experimental, descrit en l'apartat 3.4.1 del capítol 4, ens permet enregistrar el corrent en un elèctrode de mercuri recobert amb una monocapa de fosfolípids modificada amb gramicidina, durant un període de temps després de l'aplicació d'un pols de potencial al sistema. La interpretació d'aquesta variació del corrent es fa en base a un model que incorpora com a fenòmens fonamentals: la difusió d'un ió metàl·lic en el si de la dissolució, la dinàmica conformacional dels canals en la monocapa, i un procés cinètic heterogeni de primer ordre, de pas a través dels canals.

Aquí es presenten ara les bases matemàtiques que ens permeten passar de les dades experimentals al model teòric.

## 7.2 La funció de convolució. Semiintegració

La convolució d'un corrent faradaic amb una funció apropiada  $g(t)$ , permet obtenir dades de la concentració d'una espècie electroactiva que desapareix en la superfície d'un electrode ( $I$ ) en la forma:

$$c(0,t) = c^* - \frac{I(t) * g(t)}{nFAD^{1/2}} \quad (7.1)$$

L'elecció de la funció de convolució  $g(t)$  depèn de la geometria i les condicions de contorn del sistema(1-4). En difusió semiinfinita i geometria plana (raonable per les condicions experimentals del procés, descrites en 4.3.4.1),  $g(t) = \pi^{1/2}t^{1/2}$  i la convolució es redueix a la semiintegració:

$$I(t) * g(t) = \frac{1}{\pi^{1/2}} \int_0^t \frac{I(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (7.2)$$

Aleshores, l'equació (7.1) es pot escriure com

$$c_M(0,t) - c_M^* = - \frac{1}{nFA\sqrt{\pi D}} \int_0^t \frac{I(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (7.3)$$

expressió que ens permet relacionar la concentració de l'espècie electroactiva a la superfície de la membrana amb el corrent experimental mesurat.

La resolució numèrica de la integral de (7.3) ens permet determinar els valors que  $c_M(0,t)$  va adquirint amb el temps i determinar la seva dependència temporal. El càlcul numèric d'aquesta integral s'ha fet utilitzant el mètode de Huber(5), descrit en l'apartat 1.2.1.2 del capítol 6, atesa la similitud del "kernel" d'integració amb l'estudiat en aquell cas.

### 7.3 Permeabilitat

Un concepte que es demostra especialment útil és el de permeabilitat (local) de la membrana, definit com la relació entre el flux i la concentració de l'espècie electroactiva en la interfície dissolució – monocapa lipídica:

$$P(t) \equiv D_M \frac{\left( \frac{\partial c_M(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0}}{c_M(0,t)} \quad (7.4)$$

La permeabilitat, així definida, es pot relacionar amb el corrent experimental. Efectivament, suposem que l'espècie electroactiva es difon des del si de la dissolució i travessa la monocapa lipídica a través d'un conjunt de canals iònics. En geometria plana el procés de difusió es descriu com :

$$\frac{\partial c_M(x,t)}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 c_M(x,t)}{\partial x^2} , \quad (7.5)$$

on  $D_M$  correspon al coeficient de difusió de l'espècie M.

Les condicions inicial i de difusió semiinfinita s'escriuen:

$$c_M(x,0) = c_M^* , \forall x, \text{ (perfil pla)} \quad (7.6)$$

$$c_M(\infty,t) = c_M^* , \forall t \geq 0 \quad (7.7)$$

La condició de contorn addicional correspon a la definició de la permeabilitat (7.4).

L'aplicació de transformades de Laplace a l'equació de difusió (7.5) ens porta a:

$$D_M \frac{d \bar{c}_M(x,s)}{d x^2} = s \bar{c}_M(x,s) - c_M^* , \quad (7.8)$$

que té per solució, en l'espai transformat:

$$\bar{c}_M(x,s) = A(s) \cdot e^{\sqrt{\frac{s}{D_M}} x} + B(s) \cdot e^{-\sqrt{\frac{s}{D_M}} x} + \frac{c_M^*}{s} \quad (7.9)$$

L'aplicació de la condició de difusió semiinfinita (7.7) que acota la solució quan  $x$  tendeix a infinit, obliga a prendre a la constant  $A(s)$  valor nul per mantenir el significat física de la solució. Aleshores,

$$\bar{c}_M(x, s) = B(s) \cdot e^{-\sqrt{\frac{s}{D_M}} x} + \frac{c_M^*}{s} \quad (7.10)$$

que per  $x = 0$  porta a :

$$\bar{c}_M(0, s) = B(s) + \frac{c_M^*}{s} \Rightarrow B(s) = \bar{c}_M(0, s) - \frac{c_M^*}{s} \quad (7.11)$$

Derivant l'expressió (7.10) per  $x = 0$  tenim:

$$\left( \frac{\partial \bar{c}_M(x, s)}{\partial x} \right)_{x=0} = -\sqrt{\frac{s}{D_M}} B(s) \quad (7.12)$$

o el que és el mateix:

$$B(s) = -\sqrt{\frac{D_M}{s}} \cdot \left( \frac{\partial \bar{c}_M(x, s)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (7.13)$$

De (7.11) i (7.13) podem escriure que:

$$\bar{c}_M(0, s) - \frac{c_M^*}{s} = -\sqrt{\frac{D_M}{s}} \cdot \left( \frac{\partial \bar{c}_M(x, s)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (7.14)$$

i destransformant:

$$c_M(0, t) - c_M^* = -\sqrt{\frac{D_M}{\pi}} \int_0^t \frac{\left( \frac{\partial c_M(x, \tau)}{\partial x} \right)_{x=0}}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (7.15)$$

que coincideix plenament amb l'equació (7.3).

De la definició (7.4) i de l'expressió del corrent en funció del flux

$$I(t) = nFAD_M \left( \frac{\partial c_M(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (7.16)$$

podem escriure que:



$$P(t) \cdot c_M(0,t) = \frac{I(t)}{nFA} \quad (7.17)$$

i, per tant, usant (7.15)

$$I(t) = P(t) \cdot \left( nFAc_M^* - \frac{1}{\sqrt{\pi D_M}} \int_0^t \frac{I(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \right) \quad (7.18)$$

que es pot calcular utilitzant el mateix procediment descrit en l'apartat anterior.

Apart de poder-se calcular a partir dels corrents experimentals,  $P(t)$ , es pot modelitzar a partir de la combinació d'un model cinètic per la permeació de la capa lipídica i un model per l'equilibri d'activació i desactivació dels canals iònics sobre la mateixa. Aleshores, la mateixa equació integral (7.18) pot utilitzar-se per calcular els corrents que serien previsibles en cada instant.

Així, l'equació (7.18) pot utilitzar-se en una doble vessant: a) suposat un model teòric per la permeabilitat de la membrana, calcular els corrents esperats; i b) donats uns corrents experimentals, obtenir una funció per  $P(t)$ . La reintroducció de les dades obtingudes per la via b) en el procés a) ens permet contrastar la bondat del mètode o disposar d'un mètode iteratiu per refinar els valors dels paràmetres que intervenen en l'expressió de  $P(t)$ , tal com s'indica, de forma esquemàtica, en la figura 7.1

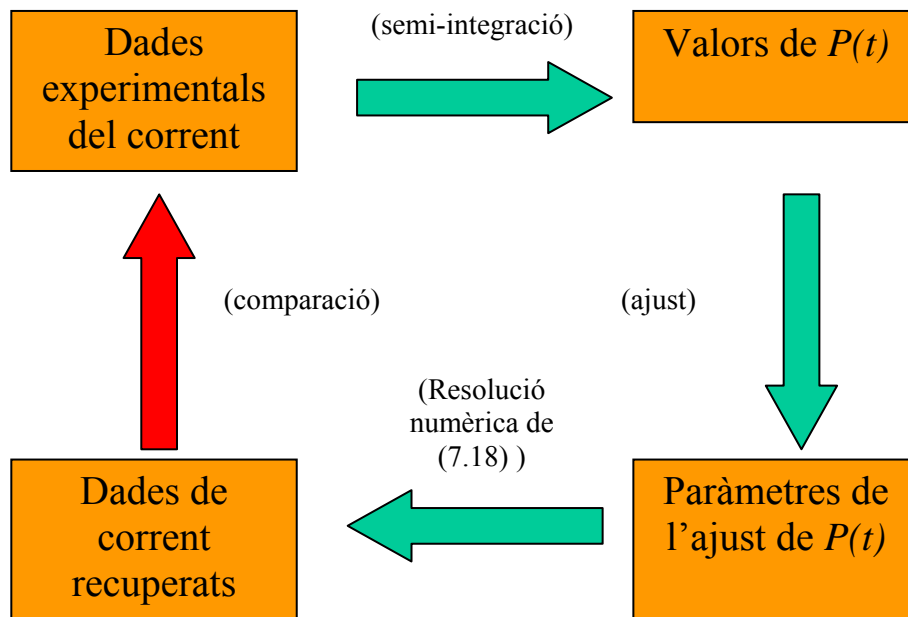


Figura 7.1: Descripció esquemàtica del procés de modelització indicat com a via (b) en el paràgraf anterior: dels corrents experimentals obtenim uns valors de permeabilitat en funció del temps, ajustar aquestos valors a una dependència funcional per obtenir els millors paràmetres i aplicar-los a 7.18 per obtenir uns corrents sintètics (fletxes verdes) que es poden comparar (fletxa vermella) amb els originals.

#### 7.4 Model per a la permeabilitat

En el dispositiu experimental descrit en l'apartat 3.4.1 del capítol 4 s'utilitza gramicidina com a medi permeant que s'afegeix a la monocapa lipídica que recobreix l'elèctrode de gota de mercuri. En diferents treballs (6,7)s'ha descrit l'estructura d'aquest pèptid i l'existència de dues formes: una conductora o activa (canal obert) que indicarem com  $Gr^*$ , que correspon a l'espècie monomolecular  $\beta^{6.3}$ , i una altra forma inactiva, o de canal tancat, que pot correspondre a un cúmulo d'agregats de gramicidina, hèlixs en orientacions no adequades o cargolades i que indicarem com  $Gr$ .

Suposem un procés cinètic de primer ordre per la interconversió d'una forma en un altra amb constants  $k_+$  per l'activació i  $k_-$  per la desactivació:



Per aquest procés podem escriure l'equació cinètica:

$$\frac{d[\text{Gr}^*]}{dt} = k_+[\text{Gr}] - k_-[\text{Gr}^*] \quad (7.20)$$

Definim la fracció de gramicidina activa en un moment donat,  $q$  com:

$$q = \frac{[\text{Gr}^*]}{[\text{Gr}^*] + [\text{Gr}]} = \frac{[\text{Gr}^*]}{[\text{Gr}]_{\text{total}}} \quad (7.21)$$

La variació amb el temps d'aquesta fracció la podem escriure com:

$$\frac{dq}{dt} = k_+ - (k_+ + k_-) \cdot q \quad (7.22)$$

La integració aquesta equació diferencial ens porta a:

$$\int_{q_0}^q \frac{dq}{k_+ + (k_+ + k_-)q} = \int_0^t dt \quad (7.23)$$

Dient  $q_0$  a la fracció inicial de gramicidina activa i efectuant unes senzilles manipulacions tenim que:

$$q = \frac{k_+}{k_+ + k_-} - \frac{k_+ - (k_+ + k_-)q_0}{k_+ + k_-} e^{-(k_+ + k_-)t} \quad (7.24)$$

Si fem que  $t$  tendeixi a infinit en l'expressió anterior, podem donar significat físic a la

relació  $\frac{k_+}{k_+ + k_-}$ . Efectivament, es tracta de la fracció de gramicidina que es manté activa

a temps molt llarg, o quan s'ha arribat a un equilibri en la interconversió de les dues formes del pèptid.

$$\frac{k_+}{k_+ + k_-} = \frac{[\text{Gr}^*]_{\infty}}{[\text{Gr}]_{\text{total}}} \quad (7.25)$$

Aleshores, desenvolupant i simplificant l'equació (7.24) podem posar que:

$$[\text{Gr}^*] = [\text{Gr}^*]_{\infty} + ([\text{Gr}^*]_0 - [\text{Gr}^*]_{\infty}) e^{-k_{\Sigma} t} \quad (7.26)$$

on

$$k_{\Sigma} \equiv k_+ + k_- \quad (7.27)$$

i que indica un decaïment exponencial de la concentració de gramicidina activa des d'un valor inicial  $[Gr^*]_0$  fins un valor d'equilibri  $[Gr^*]_\infty$ .

Abans de l'aplicació del pols de potencial, a  $t = 0$ , existeix una fracció de gramicidina activa en la monocapa lipídica i en equilibri amb la forma no conductora. L'aplicació del pols de potencial provoca una alteració en aquest equilibri inicial i el conseqüent restabliment d'un nou equilibri. Mentre es produeix el procés, el nombre de canals actius canvia fins arribar a la nova fracció en equilibri.

Ara suposem una cinètica heterogènia de primer ordre, i de constant  $k_2$ , pel pas de l'espècie M a través del canal, que es correspon amb l'esquema:



on  $M_{\text{solució}}$  fa referència a l'espècie M en la superfície del lípid en contacte amb la solució, i  $M_{\text{internalitzat}}$  indica l'espècie  $M^0$  amalgamada en la gota de mercuri de l'elèctrode.

La velocitat d'internalització, mesurada com a corrent, és

$$I(t) = n \cdot F \cdot A \cdot k_2 \cdot [Gr^*] \cdot c_M(0, t) \quad (7.29)$$

Combinant aquesta equació amb la definició (7.4) de permeabilitat tenim:

$$P(t) = \frac{I(t)}{n \cdot F \cdot A \cdot c_M(0, t)} = k_2 \cdot [Gr^*] \quad (7.30)$$

i, si hi substituïm (7.26), obtenim:

$$P(t) = k_2 \cdot [Gr^*]_\infty + \left( k_2 \cdot [Gr^*]_0 - k_2 \cdot [Gr^*]_\infty \right) \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (7.31)$$

Definim

$$P_\infty \equiv k_2 \cdot [Gr^*]_\infty \quad (7.32)$$

que indicaria la permeabilitat a temps infinit, i

$$P_\Delta \equiv \left( k_2 \cdot [Gr^*]_0 - k_2 \cdot [Gr^*]_\infty \right) \quad (7.33)$$

que pot interpretar-se com el canvi en  $P(t)$  des de l'instant inicial fins que s'arriba a l'equilibri.

Així, amb aquestes hipòtesis, la permeabilitat pot descriure's com una funció exponencial decreixent

$$P(t) = P_{\infty} + P_{\Delta} \cdot e^{-k_{\Sigma} \cdot t} \tag{7.34}$$

i la interpretació dels paràmetres pot observar-se més clarament en la figura 7.2.

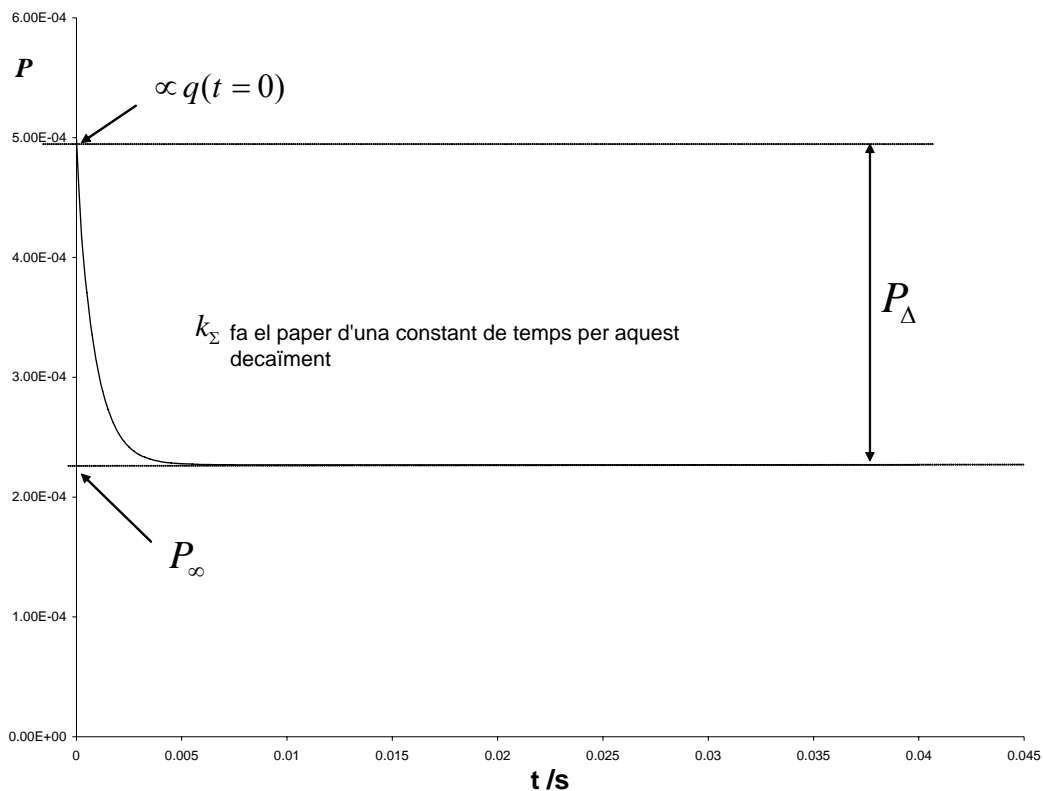


Figura 7.2: Interpretació física del paràmetres que intervenen en  $P$ . Les dades s'han obtingut per semiintegració d'uns valors experimentals de corrents i ajustant els valors obtinguts a la funció .

En el capítol 11 es presentarà la discussió del model de Permeabilitat Decaïent Exponencialment amb el temps descrit per l'equació (7.34) i l'aplicació d'aquest model a la interpretació de la permeabilitat de la membrana modificada amb gramicidina, a partir dels corrents experimentals. En el capítol 12 es presentarà l'anàlisi de l'impacte de diversos additius sobre la monocapa lipídica modificada i un refinament al model

EDP per poder-lo aplicar a altres rangs de potencials diferents als corresponents als de la regió de reducció del  $Tl^+$ .

## 7.5 Referències

1. Oldham, K. B. Convolution - A General Electrochemical Procedure Implemented by a Universal Algorithm. *Anal.Chem.* **1986**, *58*, 2296-2300.
2. Oldham, K. B. The extraction of kinetic-parameters from chronoamperometric or chronocoulometric data. *J.Electroanal.Chem.* **1983**, *145*, 9-20.
3. Oldham, K. B. Interrelation of Current and Concentration at Electrodes. *J.Appl.Electrochem.* **1991**, *21*, 1068-1072.
4. Oldham, K. B.; Myland, J. C. *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press: San Diego, 1994.
5. Huber, A. *Monatshefte Fur Chemie* **1939**, *47*, 240-
6. Killian, J. A. Gramicidin and gramicidin lipid interactions. *Biochim.Biophys.Acta* **1992**, *1113*, 391-425.
7. Ulrich, W. P.; Vogel, H. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the water interface. *Biophys.J.* **1999**, *76*, 1639-1647.

III. Aplicació a  
Sistemes  
Experimentals





# Capítol 8

Influència de l'adsorció en el corrent

límit NPP i RPP en sistemes làbils

metall-macromolècula

Part d'aquest capítol ha estat publicat a  
**Journal of Electroanalytical Chemistry** 457 (1998) 229-246

---

## 8. Influència de l'adsorció en el corrent límit NPP i RPP en sistemes làbils metall-macromolècula

### 8.1 Introducció

En l'anàlisi voltamperomètrica de sistemes metall-macromolècula sovint s'ha utilitzat el desplaçament del potencial de semionada o la disminució del corrent límit amb l'augment de la concentració total de lligand, per caracteritzar les constants d'estabilitat de complexos metàl·lics làbils en condicions d'excés de lligand (1,2). L'ús d'aquests mètodes tenen avantatges, però també limitacions, que han estat descrits àmpliament (3) (4).

Aquests tipus de sistemes sovint pateixen fenòmens d'adsorció. En aquestes circumstàncies, la concurrència simultània d'efectes de complexació i d'adsorció desdibuixen els resultats experimentals i dificulten la seva interpretació, ja que tant el desplaçament del potencial de semionada com la disminució del corrent límit es veuen afectats per l'adsorció (5) (6)

Una manera de resoldre parcialment aquest problema és usar la tècnica RPP (7). S'ha demostrat (8) que sota condicions d'excés de lligand, els corrents límit RPP no es veuen afectats pels efectes de l'adsorció de les espècies electroactives o els seus complexos (adsorció induïda) sempre i quan el complex sigui làbil. La implementació matemàtica de la condició d'excés de lligand es basa en un perfil pla de concentració pel lligand amb una pertorbació negligible respecte la concentració total de lligand. Aquestes condicions, però, semblen difícilment justificables quan el lligand desenvolupa un perfil de concentració en la capa de difusió degut a la seva adsorció, fins i tot si la

concentració total de lligand en el si de la dissolució és molt més gran que la concentració total de metall.

Per una relació de lligand a metall qualsevol, l'adsorció de complex, per si mateixa, no influencia els corrents límits RPP (4). Tanmateix l'adsorció induïda de complex sense una adsorció simultània de lligand sembla improbable i cal analitzar quin és l'efecte de l'adsorció del lligand.

Des del punt de vista de la matemàtica, la consideració de qualsevol relació de lligand a metall condueix a un sistema no lineal d'equacions que descriuen el transport de lligand (complexat o no) i la difusió del metall (ja sigui lliure o enllaçat). El mètode de Diferències Finites s'ha utilitzat en la determinació numèrica de la solució d'aquest sistema(3,9), tot i que el Mètode d'Elements Finitos ofereix la mateixa precisió amb un menor cost computacional (4,10). La manca de linealitat involucrada en aquest context es posa de manifest en que la relació metall complexat versus metall lliure ja no es manté constant en la capa de difusió, - sí que ho era en condicions d'excés de lligand,- i fa que el corrent límit normalitzat ( $\phi = I_{\text{lim}}(\text{amb lligand}) / I_{\text{lim}}(\text{sense lligand})$ ) depengui de la concentració total de metall. Aquesta dependència pot arribar a ser no negligible fins i tot en absència d'adsorció(11).

A més d'aquestes dificultats matemàtiques, la interpretació dels resultats experimentals sota condicions de no excés de lligand esdevé encara més complicada a causa de la dependència del corrent límit del model concret de complexació del sistema. En general, les característiques concretes del model de complexació influeixen en la relació de concentracions  $\frac{c_{\text{ML}}}{c_{\text{M}} c_{\text{L}}}$  que depèn de les coordenades espacial i temporal al llarg de la

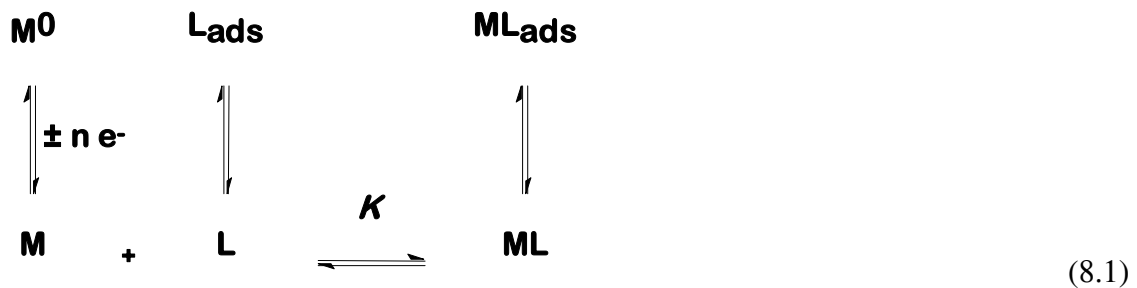
---

capa de difusió. En condicions d'excés de lligand, qualsevol model de complexació esdevé homogeni i independent del model, i.e., la relació  $\frac{c_{ML}}{c_M c_L}$  és independent de les concentracions i es correspon amb la constant d'estabilitat  $K$ , una mena d'afinitat intrínseca mitjana dels setis(11,12). Així, en excés de lligand, es pot suposar, sense pèrdua de generalitat, una complexació homogènia i independent del model. Recíprocament, l'estudi de les característiques particulars de complexació d'un sistema (tal com la heterogeneïtat dels setis lliures o la interacció entre setis ocupats) requereix condicions de qualsevol relació de lligand a metall.

En aquest capítol s'analitzen, utilitzant la metodologia i els instruments desenvolupats i descrits en el capítol 5, els efectes de l'adsorció en els corrents límit NPP i RPP per qualsevol relació de metall a lligand. La secció 2 repassa les condicions bàsiques i la formulació matemàtica del problema. En la secció 3 s'analitzen els efectes de l'adsorció del lligand i del complex en els corrents límit. En la secció 4 es presenten expressions analítiques aproximades pel corrent límit de cara a determinar el valor de  $K$ , i aquestes expressions s'apliquen en la secció 5 als resultats experimentals dels sistemes Zn i Cd / àcid polimetacrílic.

## 8.2 Model Físic

Considerem el problema de l'adsorció induïda d'un reactiu, consistent en un ió metàl·lic (M) que forma un complex (ML) amb un lligand (L) i que tots dos, L i ML, s'adsorbeixen sobre l'elèctrode. Suposem, també, que tant la reacció homogènia, com els processos heterogenis de transferència electrònica i d'adsorció assoleixen condicions d'equilibri. El problema es pot esquematitzar com



on la reacció de complexació se suposa suficientment ràpida per poder considerar que en tot moment les concentracions de les diferents espècies es relacionen per l'equació d'equilibri

$$K = \frac{c_{\text{ML}}}{c_{\text{M}} c_{\text{L}}} \tag{8.2}$$

on  $K$  és la constant d'estabilitat del complex. Les concentracions totals de les espècies formals metall total i lligand total es defineixen com  $c_{\text{T,M}} \equiv c_{\text{M}} + c_{\text{ML}}$  i  $c_{\text{T,L}} \equiv c_{\text{L}} + c_{\text{ML}}$ .

La reacció de transferència electrònica és electroquímicament reversible i el procés d'adsorció és també prou ràpid per poder-lo descriure amb isoterms. Se suposa una isoterma langmuiriana per l'adsorció del complex i del lligand. Els coeficients respectius d'adsorció són  $K_{\text{ML}}$  i  $K_{\text{L}}$ .  $D_{\text{L}}$  és el valor del coeficient de difusió, considerat comú per L i ML.

L'esquema (8.1) també pot considerar-se com la formulació reduïda (13,14) d'un sistema macromolecular làbil, en el que totes les espècies macromoleculares tenen el mateix nombre fix de setis homogenis i independents i el mateix coeficient de difusió(15,16).

La formulació matemàtica de l'esquema s'ha presentat en el capítol 5 d'aquesta tesi acompanyada d'alguns detalls de l'aplicació del mètode d'Elements Finites de Galerkin (4,17), que és el que s'ha emprat en la resolució numèrica del problema.

### 8.3 Corrents límit RPP i NPP per qualsevol relació de lligand a metall.

#### 8.3.1 El cas sense adsorció

Quan  $c_{T,L}^* \gg c_{T,M}^*$ , l'expressió pel corrent límit normalitzat en condicions d'excés és la ben coneguda (3)

$$\phi \approx \bar{\phi} \equiv \sqrt{\frac{1 + \varepsilon K c_{T,L}^*}{1 + K c_{T,L}^*}} \quad (8.3)$$

on  $\varepsilon \equiv \frac{D_L}{D_M}$ , essent  $D_M$  el coeficient de difusió del ió metàl·lic.  $\varepsilon \ll 1$  per a sistemes

macromoleculars.

Si bé no es coneixen expressions analítiques rigoroses pels corrent límit NPP i RPP per qualsevol relació lligand a metall, es poden deduir algunes propietats dels corrents a partir de les característiques de les equacions implicades. Es pot demostrar (18) que el corrent normalitzat depèn dels productes  $K c_{T,M}^*$  i  $K c_{T,L}^*$ , en lloc de  $c_{T,M}^*$ ,  $c_{T,L}^*$  i  $K$  per separat.

Suposant difusió plana i per un temps de pols fix ( $t_p$ ), és ben sabut que el corrent límit NPP és igual al corrent límit RPP en excés de lligand. Aquesta igualtat es pot deduir fàcilment usant el principi de superposició per deduir una expressió per a  $I_{lim, RP}$  (8,19). També es pot demostrar la propietat  $I_{lim} (NPP) = I_{lim} (RPP)$  suposant difusió plana, malgrat que la formulació matemàtica corresponent a qualsevol relació lligand a metall no sigui lineal(20). Així, els marcadors  $\blacklozenge$  de la Fig. 8.1 també poden interpretar-se com els corresponents al corrent límit RPP.

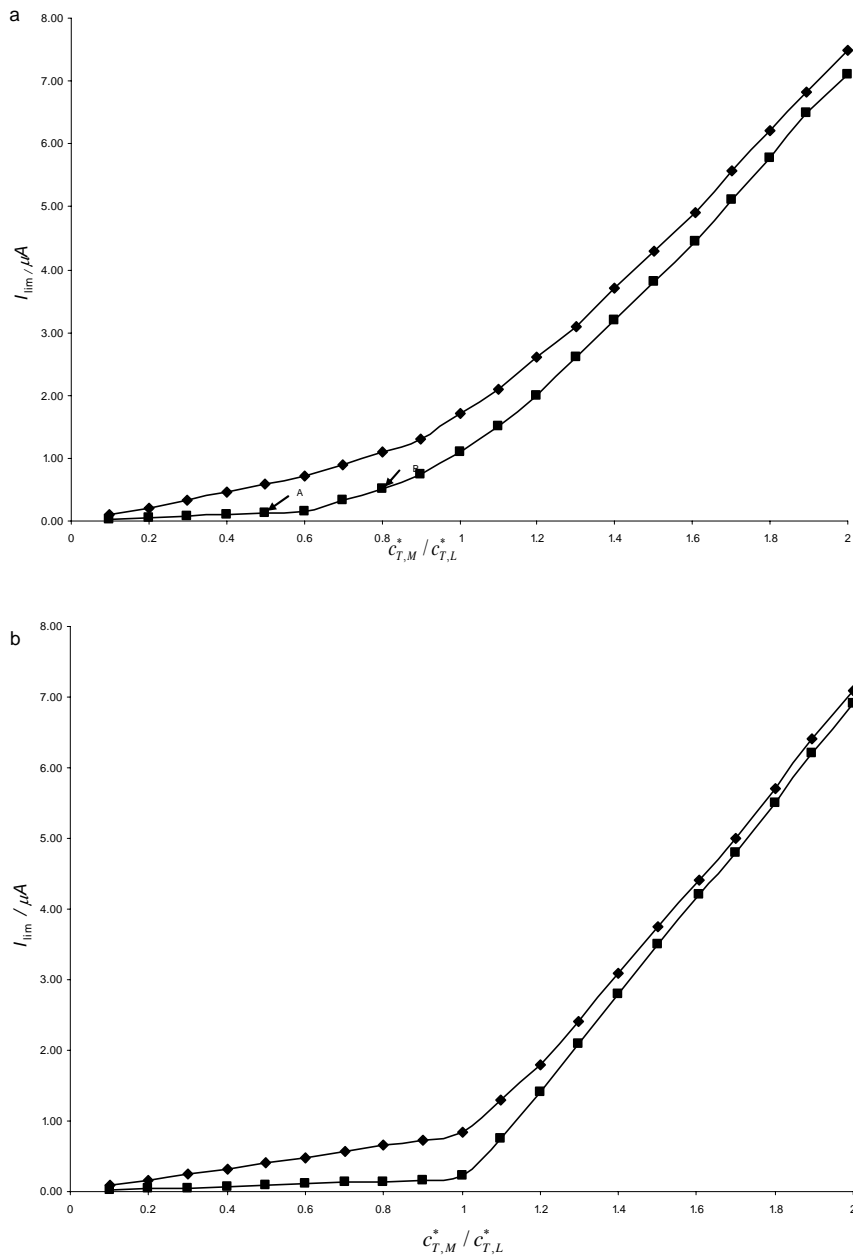


Figura 8.1: Efecte de l'adsorció de complex en les gràfiques  $I_{\text{lim}}(\text{NPP})$  vs.  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$ , quan no hi ha adsorció de lligand, per dos valors de la constant d'estabilitat:  $K=10^2 \text{ mM}^{-1}$  ( gràfic a) i  $K=10^4 \text{ mM}^{-1}$  (gràfic b). El marcador ( $\blacklozenge$ ) correspon al cas sense cap mena d'adsorció, i el marcador ( $\blacksquare$ ) correspon a una adsorció de complex forta ( $\Gamma_m=5 \cdot 10^{-5} \text{ mol m}^{-2}$  i  $K_{ML}=10^5 \text{ mM}^{-1}$ ). La resta de paràmetres:  $n=2$ ,  $T=298.15\text{K}$ ,  $A=0.52 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$ ,  $t_d=1\text{s}$ ,  $t_p=50\text{ms}$ ,  $D_{M0}=2 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $D_L=5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $D_M=7.3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  i  $c_{T,L}^*=1 \text{ mM}$ .

Se'n dedueixen dues conclusions: i) la magnitud de les desviacions respecte l'excés de lligand, en cada tècnica, és la mateixa, i ii) per un  $t_p$  fixe,  $I_{\text{lim}}$  (RPP) és independent del



temps de vida de la gota ( $t_d$ ) (com en NPP sense adsorció que només depèn de  $t_p$ ).

Per altra banda, la dependència lineal de  $I_{\text{lim}}$  amb  $c_{\text{T,M}}^*$ , que es donava sota condicions d'excés de lligand, deixa de ser vàlida per qualsevol relació de lligand a metall. A mesura que  $K$  augmenta, es fa més palès el canvi en el pendent de la corba  $I_{\text{lim}}$  vs.  $c_{\text{T,M}}^*$  (compareu les corbes superiors de la Fig 8.1a i 8.1b) a un valor d'abscissa proper al punt d'equivalència. Per això, les gràfiques  $I_{\text{lim}}$  vs.  $c_{\text{T,M}}^*$  permeten la determinació de la capacitat complexant per valoració amb un metall unit fortament al lligand present en la mostra (vegeu la Fig. 8.1) (1). Efectivament, per valors prou grans de  $K$ , quan  $c_{\text{T,M}}^* < c_{\text{T,L}}^*$ , només hi ha complex i el corrent depèn de  $c_{\text{T,M}}^*$  i  $\sqrt{D_L}$ . Llavors

$$\lim_{K c_{\text{T,M}}^* \rightarrow \infty} \phi = \sqrt{\frac{D_L}{D_M}} \quad (8.4)$$

Per altra banda, quan  $c_{\text{T,M}}^* > c_{\text{T,L}}^*$ , també hi ha metall lliure i el corrent depèn de  $\sqrt{D_M}$ .

Això comporta el canvi en el pendent dels gràfics de  $I_{\text{lim}}$  vs.  $c_{\text{T,M}}^*$  (3).

### 8.3.2 Cas amb adsorció

#### 8.3.2.1 Només s'adsorbeix el complex

La dependència de  $I_{\text{lim}}$  (NPP) respecte de l'adsorció de complex per una relació qualsevol de lligand a metall ha estat estudiada prèviament (4,21). Pel que aquí ens afecta, cal notar que l'adsorció de complex redueix el valor de  $I_{\text{lim}}$  (NPP) i augmenta el canvi del pendent de la corba de calibració (compareu les corbes superior i inferior en els respectius gràfics de la Fig. 8.1), però l'abscissa d'aquest canvi es desplaça a valors més baixos de  $c_{\text{T,M}}^*$  ja que la mobilitat del complex és més baixa que la del ió metàl·lic. Per tant, quan tenim adsorció de complex poden donar-se inexactituds en la

determinació de la capacitat complexant a partir dels corrents límit NPP(13), tal com es mostra en la corba inferior de la Fig. 8.1a. Els gràfics dels perfils de concentració mostrats en la Fig. 8.4, i que corresponen als punts A i B en la Fig. 8.1a, mostren que, malgrat que gairebé no hi ha metall lliure en el si de la solució ( $c_{T,M}^* < c_{T,L}^*$  i  $K = 10^2 \text{ mM}^{-1}$ ), el ràpid transport de ió metàl·lic (l'espècie de mobilitat més alta) cap a la superfície de l'elèctrode durant l'interval  $(0, t_0)$  per formar complex (que és fortament adsorbit) redueix la concentració de lligand en la capa de difusió (vegeu Figs. 8.2a i 8.2c). La concentració de lligand a l'elèctrode cau a zero i el posterior transport de l'ió metàl·lic fa que s'aplani el perfil de concentració de M. Així, a  $t$  tot just abans de  $t_0$ , la concentració de metall lliure a la superfície de l'elèctrode pot esdevenir més gran que la concentració de lligand, encara que aquesta desigualtat pugui tenir signe oposat en el si de la solució, (vegeu Fig. 8.2c, que correspon al punt B de la Fig. 8.1a). La presència de metall lliure a la vora de l'elèctrode porta a un augment del corrent, mesurat al temps de caiguda de la gota, que depèn de  $\sqrt{D_M}$ .

Si el valor de  $K$  és prou gran, el perfil de concentració de M encara es redueix més i en resulta que no queda metall lliure disponible per desplaçar-se ni, en conseqüència per complexar-se i adsorbir-se a la superfície de l'elèctrode. Així, el perfil de concentració del lligand no es redueix pel transport del ió metàl·lic (compareu les Fig. 8.2a i 8.2c) i l'abscissa del punt que presenta el canvi de pendent més gran en la corba de calibració no es desplaça, tal com es veu en la Fig. 8.1b.

Les Fig. 8.2a i 8.2c també mostren que, a  $t = t_0$ , el perfil de concentració del lligand s'aparta de la forma típica de la funció d'error (que es dona quan el transport d'una substància es troba limitat per la difusió) ja que apareix un màxim. L'existència del

---

màxim pot entendre's si es té en compte que el metall lliure és l'espècie de mobilitat més elevada. El ràpid transport d'aquest (cap a l'elèctrode) obliga el complex a dissociar-se, i a incrementar, així, la concentració del lligand a una distància intermèdia de l'elèctrode. Prop del mateix, però, com ja s'ha dit, l'efecte predominant és la complexació del lligand pel metall lliure que arriba per formar el complex que serà adsorbit (vegeu Fig. 8.2a). Mentre  $t_0 < t < t_d$ , la reducció del material adsorbit pel pols de potencial aplicat fa augmentar la concentració del lligand prop de l'elèctrode, mentre que les concentracions del ió metàl·lic i del complex desapareixen a la superfície de l'elèctrode (vegeu Figs. 8.2b i 8.2d).

Pel que fa a la tècnica RPP,  $I_{lim}$  (RPP) no està influenciada per l'adsorció del complex en sistemes làbils(8,22). En efecte, per la manera d'operar en aquesta tècnica, el complex no es pot adsorbir sobre l'elèctrode durant la primera etapa RPP, ja que les concentracions de metall lliure i de complex són nul·les a la superfície de l'elèctrode (el metall lliure, per les condicions reductores, i el complex per la labilitat). Durant el pols invers de potencial ( $t > t_0$ ), el transport de metall reduït a l'interior de l'amalgama cap a la superfície electròdica és independent de qualsevol altre fenomen en la solució, mentre la condició de contorn  $c_{M^0}(0,t) = 0$  es mantingui. Aleshores, tal com es veu a la Fig. 8.3, on es considera adsorció forta del complex, l'abscissa corresponent al màxim canvi en el pendent en la corba de calibració no es desplaça (i el canvi en el pendent és fins i tot més pronunciat) permetent la determinació de la capacitat complexant si  $K$  és prou gran.

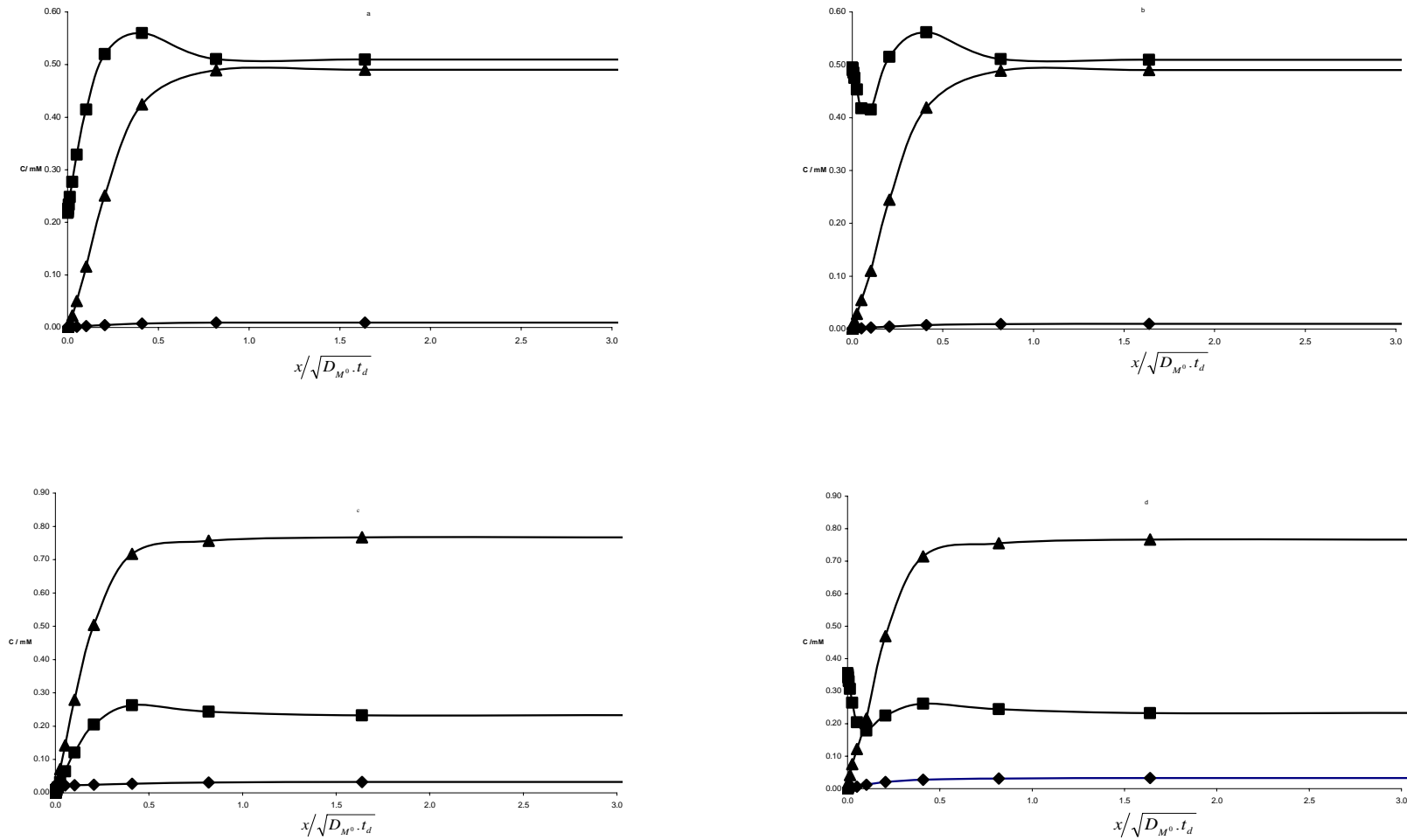


Figura 8.2: Perfils de concentració de M (◆), ML (▲) i L (■) en NPP amb adsorció només de complex. (a) ( $t = t_0$ ) i (b) ( $t = t_d$ ) corresponen al punt A de la figura 8.1a ( $c_{T,M}^*/c_{T,L}^* = 0.5$ ,  $K_{ML} = 10^5 \text{ mM}^{-1}$ ). (c) ( $t = t_0$ ) i (d) ( $t = t_d$ ) corresponen al punt B de la figura 8.1a ( $c_{T,M}^*/c_{T,L}^* = 0.8$ ,  $K_{ML} = 10^5 \text{ mM}^{-1}$ ). La resta de paràmetres com en la figura 8.1a.

La Figura 8.4 mostra el perfil de concentracions corresponents als punts assenyalats com A i B en la Fig. 8.3 (la relació  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$  en el punt A de la Fig. 8.3 és igual a la del punt B en la Fig. 8.1). Fins a  $t_0$  el lligand s'acumula en la capa de difusió a causa de la reducció de M i de ML en condicions controlades per difusió. Donat que  $D_{ML} = D_L$  i no hi ha adsorció de lligand, el perfil de concentració de l'espècie lligand total és pla i igual a  $c_{T,L}^*$  ja que no hi ha cap fenomen físic

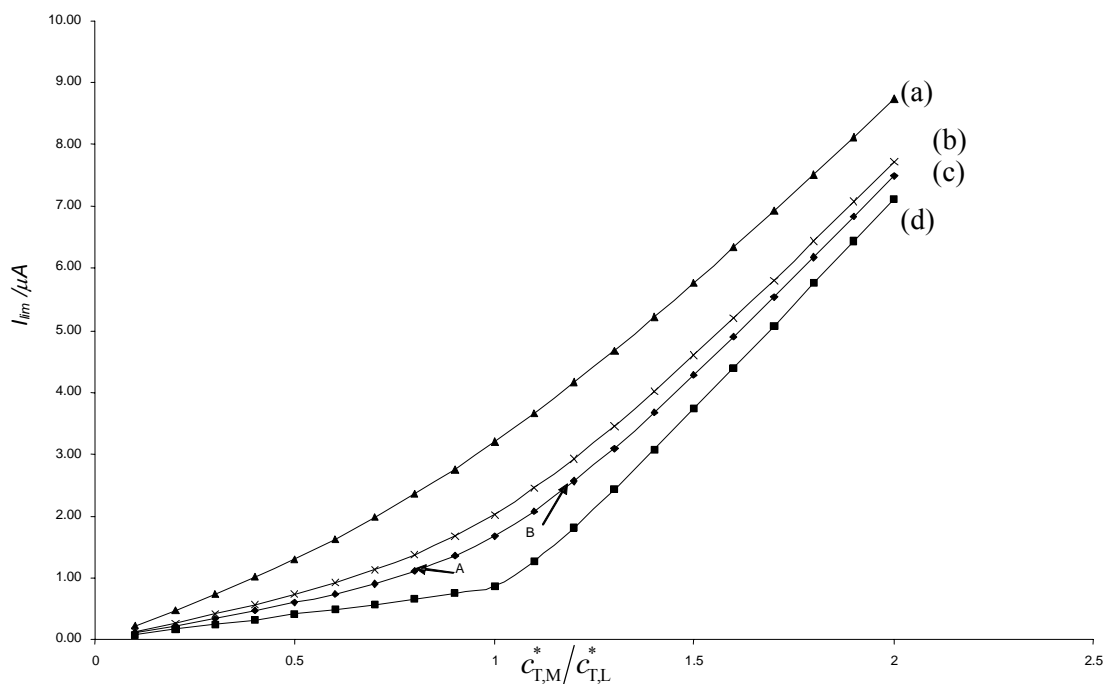


Figura 8.3: Efecte del valor de la constant d'estabilitat sobre  $I_{lim}(RPP)$  vs  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$ . Només hi ha adsorció del complex. Els marcadors indiquen el corrent sense adsorció de complex. Els paràmetres utilitzats són  $K = 10$  (a),  $K = 50$  (b),  $K = 10^2$  (c) i  $K = 10^4$  (d)  $\text{mM}^{-1}$ ,  $K_{ML} = 10^5 \text{ mM}^{-1}$  i la resta de paràmetres com en la figura 8.1a.

que distorsioni les condicions planes inicials. Per tant, mentre  $0 < t < t_0$ ,  $c_L$  assoleix el valor  $c_{T,L}^*$  a la superfície de l'elèctrode, i els pendents de la concentració del metall lliure i la del complex són oposades en cada punt al llarg de la capa de difusió, com mostren les Figs.

8.4a i 8.4c. Aquest augment de la concentració de lligand rellenteix la difusió del metall cap a la superfície de l'elèctrode, ja que obliga el metall a ser transportat (més lentament) en forma complexada.

Durant  $t_0 < t < t_d$  (Fig 8.4b i 8.4d), la formació de metall reoxidat (que segueix a l'aplicació del pols de potencial) disminueix la concentració de lligand al voltant de la superfície de l'elèctrode. El perfil pla de l'espècie lligand total  $c_L + c_{ML} = c_{T,L}^*$  ja no és vàlid, donat que el complex s'adsorbeix sobre l'elèctrode. Un cop la concentració de lligand a la superfície de l'elèctrode corresponent a  $t = t_d$  assoleix el valor zero, apareix un perfil de concentració de metall lliure i afavoreix el transport del metall lliure format en l'aplicació del pols cap al si de la solució (Fig. 8.4d). El transport d'aquest metall incrementa la concentració de complex com un "front" avançant cap al si de la solució i produint el màxim observat en el perfil de concentració del complex.

### 8.3.2.2 El lligand i el complex són adsorbits

El corrent límit en RPP,  $I_{lim}$  (RPP), depèn lleugerament de l'adsorció de lligand per un valor baix de  $\varepsilon$ , tal com es pot veure en la Fig. 8.6. Efectivament, mentre  $t < t_0$ , l'adsorció de lligand amorteix l'increment de la concentració de lligand en la capa de difusió (previsible per la reducció de la concentració de complex en un règim limitat per difusió) i, fins i tot, pot produir una disminució de lligand. Aquesta disminució - si més no relativa- de lligand facilita el transport del metall cap a l'elèctrode (vegeu la Fig. 8.7 pels perfils de concentració corresponents al punt A de la Fig. 8.6). Així, l'adsorció de lligand augmenta  $I_{lim}$  (RPP), però l'increment és

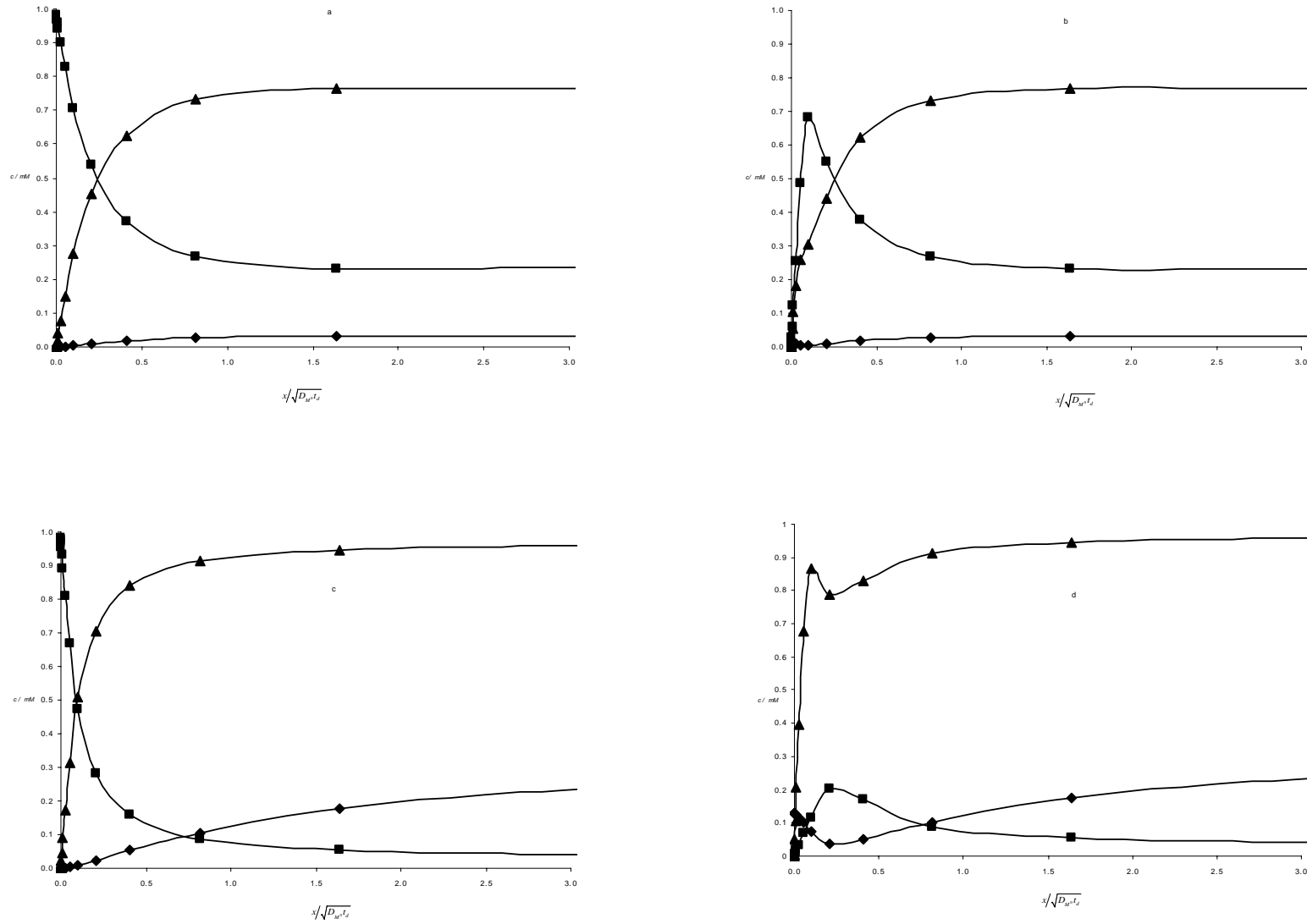


Figura 8.4: Perfils de concentració de M (♦), ML (▲) i L (■) en RPP amb adsorció només de complex. (a) ( $t = t_0$ ) i (b) ( $t = t_d$ ) corresponen al punt A de la figura 8.3 ( $c_{T,M}^*/c_{T,L}^* = 0.8$ ,  $K=10^2 \text{ mM}^{-1}$ ). (c) ( $t = t_0$ ) i (d) ( $t = t_d$ ) corresponen al punt B de la figura 8.3 ( $c_{T,M}^*/c_{T,L}^* = 1.2$ ,  $K=10^2 \text{ mM}^{-1}$ ). La resta de paràmetres com en 8.1a

moderat per un valor baix de  $\varepsilon$ , tal com s'observa en la Fig. 8.6, i tendeix a decreïxer a mesura que disminueix la concentració total de metall. Per tant, suggerim extrapolar el corrent RPP cap a condicions d'excés de lligand, i determinar la constant d'estabilitat (amb un mínim impacte de l'efecte de l'adsorció de lligand) utilitzant les expressions estàndards de les condicions d'excés de lligand. Si el procediment d'extrapolació per trobar  $\phi$  quan  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$  és prou acurat, el valor computat de  $K$  serà més baix que l'actual. En l'apartat 4 es presenten i discuteixen algunes expressions per facilitar aquest procediment d'extrapolació.

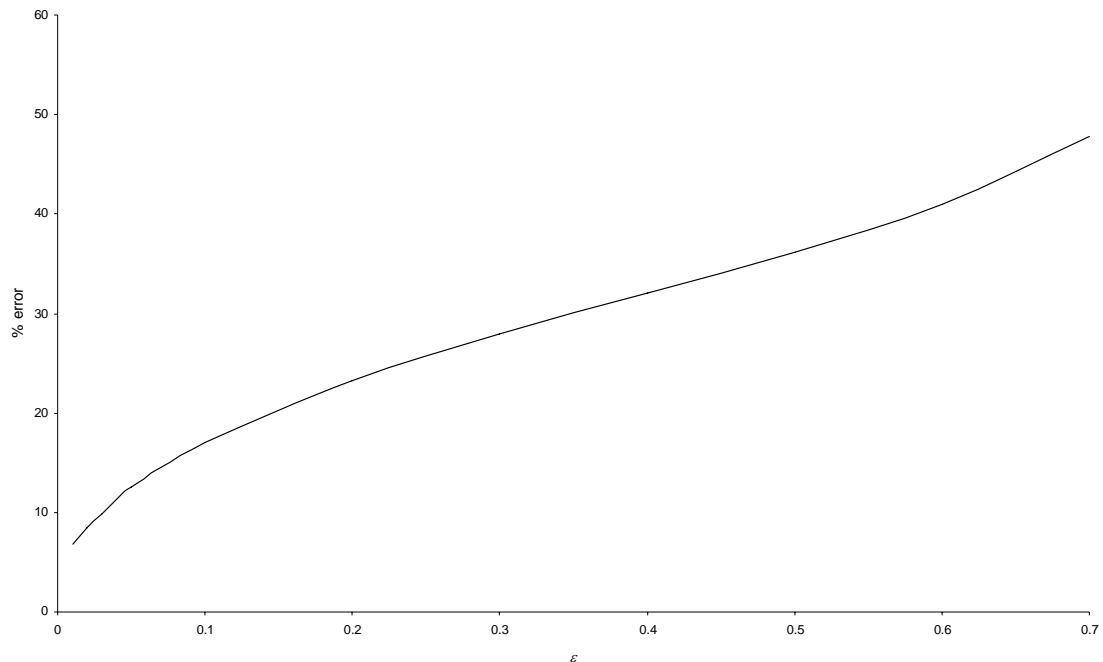


Fig 8.5.- Efecte de la relació dels coeficients de difusió ( $\varepsilon$ ) en l'error en la determinació de  $K$ , degut a l'adsorció de lligand usant la tècnica RPP i l'expressió (8.3). La relació usada en la gràfica és  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^* = 100$ ; els errors deguts al no assoliment de les condicions d'excés ja s'han descomptat.

Per tal de quantificar l'impacte de l'adsorció de lligand en la determinació de  $K$  des de la zona d'excés de lligand, cal tenir en compte:

i) En condicions d'excés i sense adsorció, s'ha demostrat(23) que la regió de més alta sensibilitat per trobar  $K$  es pot obtenir per diferenciació de  $\phi$ , donada per l'expressió (8.3),



respecte de  $K$  i  $c_{T,L}^*$ . S'obté

$$\varepsilon (K c_{T,L}^*)^2 + \frac{1}{2} K c_{T,L}^* (1 - \varepsilon) - 1 = 0 \quad (8.5)$$

que, com una primera aproximació ( $\varepsilon \approx 0$ ), porta a  $K c_{T,L}^* \approx 2$  i  $\phi \approx \sqrt{\frac{1+2\varepsilon}{3}}$ , o, més exactament

$$K c_{T,L}^* = \frac{\varepsilon - 1 + \sqrt{(1 - \varepsilon)^2 + 16\varepsilon}}{4\varepsilon} \quad (8.6)$$

ii) En el límit  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ ,  $\phi$  depèn només de  $K c_{T,L}^*$  i  $\varepsilon$ , no pas de cada paràmetre ( $K$ ,  $c_{T,L}^*$  i  $\varepsilon$ ) individualment. Això es veu fàcilment en l'expressió (8.3) pel cas sense adsorció. En el cas d'adsorció forta, el problema del transport només depèn de les concentracions en el si de la solució (la concentració volúmica de les espècies que s'adsorbeixen a la superfície de l'elèctrode és zero en condicions d'adsorció forta i sense saturació). Les concentracions en el "bulk" depenen de  $K c_{T,L}^*$ ,  $K c_{T,M}^*$  però en el límit  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ ,  $\phi$  només dependrà de  $K c_{T,L}^*$  i  $\varepsilon$ .

Així, l'impacte de l'adsorció de lligand, determinat a partir del valor límit de  $\phi$ , quan  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ , no depèn del valor concret de  $K$  sinó del de  $K c_{T,L}^*$ , el qual per la sensibilitat màxima de  $\phi$  respecte de  $K$  ve donat per l'equació (8.6). Si  $\varepsilon = 0.0685$ , l'expressió (8.6) dona  $K c_{T,L}^* = 1.715$ . Suposem que el valor més baix de concentració de metall pel que disposem de dades (directament o pel procediment d'extrapolació) correspon a un excés de  $c_{T,L}^*/c_{T,M}^* = 10$ . Resolem primer el cas sense adsorció: els càlculs usant el formalisme descrit en l'apartat 5.2.1 per qualsevol relació de lligand a metall porta a  $\phi = 0.646$ . Introduint aquest

valor en (8.3) , obtenim  $K c_{T,L}^* = 1.669$ , que significa un 2.65% d'error en la determinació de  $K$ . Aquest error es pot atribuir fàcilment al compliment incomplet de les condicions d'excés de lligand (4,10). Ara ens fixem en el cas extrem d'adsorció forta i procedim de manera anàloga: generem un corrent normalitzat (sense suposar excés de lligand i amb uns valors de  $K_{ML} = K_L = 10^5 \text{ mM}^{-1}$ )  $\phi = 0.672$ , usem l'expressió (8.3) i obtenim  $K c_{T,L}^* = 1.434$ , que significa un 16.36% d'error en la determinació de  $K$ . Es pot considerar que aquest error és degut a l'incompliment de les condicions d'excés de lligand i a l'impacte de l'adsorció forta de lligand.

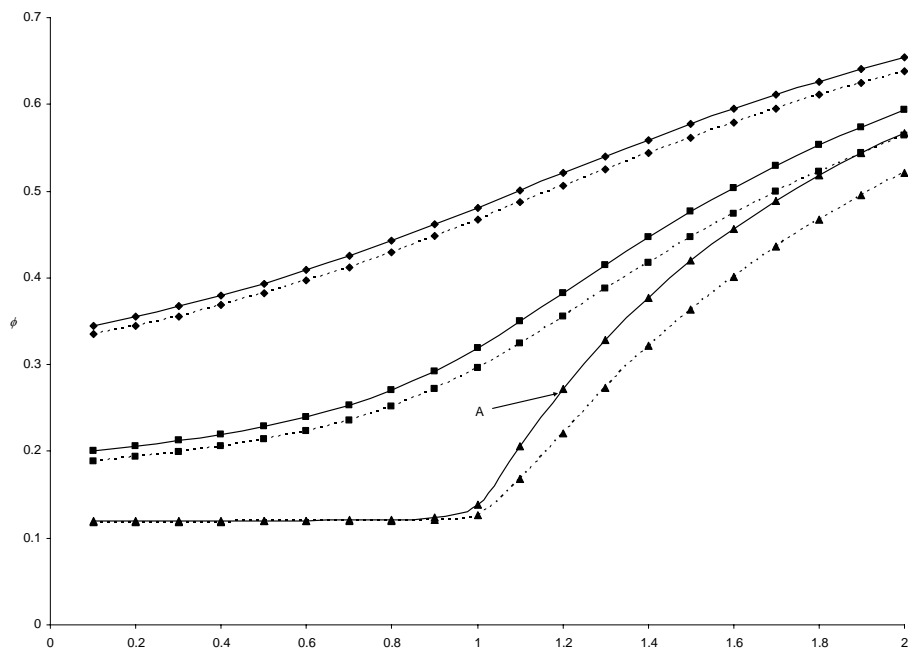


Figura 8.6 Gràfic de l'efecte de l'adsorció de lligand sobre el corrent límit normalitzat RPP vs.  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$ . Les línies discontinues indiquen  $K_L=0$ , mentre les contínues indiquen adsorció forta del lligand ( $K_L=10^5 \text{ mM}^{-1}$ ). La resta de paràmetres com en la figura 8.1a amb  $D_{ML}=D_L=10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  i  $K = 10$  (◆),  $K = 50$  (■),  $K = 10^4$  (▲)  $\text{mM}^{-1}$ .

Per tant, l'adsorció de lligand no introdueix un error addicional més gran del 14% (l'error més gran per l'adsorció forta de lligand) en la determinació de la constant d'estabilitat a partir dels valors extrapolats del corrent límit en el punt de màxima sensibilitat, quan  $\varepsilon =$

0.0685, independentment de valor de  $K$  considerat. Aquest límit superior està dins de l'ordre dels errors experimentals usuals en sistemes macromoleculars.

La Fig 8.5 mostra com depèn aquest error addicional respecte de  $\varepsilon$  (i. e. el que s'hauria d'afegir a l'error corresponent a l' incompliment de les condicions d'excés de lligand) en la determinació de  $K$  degut a l'adsorció de lligand calculada com s'ha descrit abans. Pels complexos immòbils, no hi ha error addicional ja que no hi ha una adsorció efectiva sense transport. Aquest error addicional augmenta amb la mobilitat del lligand ( $D_L$ ), i assoleix valors de fins al 50% quan  $\varepsilon > 0.7$ . Tanmateix, en aquestes condicions la disminució del corrent límit amb l'augment de  $c_{T,L}^*$  és tan petit que el mètode dels corrents normalitzats esdevé impracticable.

En conclusió, usant el corrent límit RPP a valors baixos de  $c_{T,M}^*$ , l'impacte de l'adsorció en sistemes macromoleculars (en els que  $\varepsilon$  és petit) es minimitza de forma important.

#### **8.4 Expressions analítiques aproximades pel corrent límit vàlides per qualsevol relació de lligand a metall.**

Com es pot veure en la Fig. 8.6, quan  $\phi$  esdevé independent de  $c_{T,M}^*$  (banda esquerra de la corba inferior) el seu valor límit,  $\bar{\phi}$ , a  $c_{T,M}^* = 0$  s'obté fàcilment. A mesura que disminueix la constant d'estabilitat, però, l'horitzontalitat de  $\phi$  s'assoleix a valors més baixos de  $c_{T,M}^*$ .

Encara que es pugui fer servir un procediment d'extrapolació numèrica per calcular  $\bar{\phi}$ , pot ser de gran ajuda utilitzar expressions analítiques aproximades per les gràfiques de  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$  en aquests procediments d'extrapolació que ens portin directament a una valor

ajustat per la constant d'estabilitat.

Com hem vist que, per un elèctrode pla, sense adsorció  $I_{\text{lim}}(\text{NPP}) = I_{\text{lim}}(\text{RPP})$  (vegeu l'apartat 8.3.1) busquem ara algunes expressions aproximades pel corrent límit NPP sense adsorció. Aquestes expressions es poden aplicar als resultats experimentals obtinguts en NPP (si no hi ha adsorció) o en RPP (encara que hi hagi adsorció, ja que l'adsorció de lligand té una influència mínima en el corrent límit RPP a valors baixos de  $c_{\text{T,M}}^*$ ).

L'equació de transport per l'espècie metall total descrita en (5.9) es pot reescriure usant la condició de labilitat (5.6) com

$$\frac{\partial c_{\text{T,M}}(x,t)}{\partial t} = \frac{\partial^2}{\partial x^2} \{D(x,t)c_{\text{T,M}}(x,t)\} \quad (8.7)$$

on la funció  $D(x,t)$  es defineix com:

$$D(x,t) \equiv \frac{D_{\text{M}} + D_{\text{L}} K c_{\text{L}}(x,t)}{1 + K c_{\text{L}}(x,t)} \quad (8.8)$$

i actua com un coeficient de difusió que depèn de la posició i del temps. Per NPP sense adsorció, durant el període  $t_0 < t < t_d$  es desenvolupa un perfil de concentració del lligand, mentre la concentració de l'espècie lligand total es manté plana ( $c_{\text{T,L}}(x,t) = c_{\text{T,L}}^*$ , si  $D_{\text{L}} = D_{\text{ML}}$ ) ja que no hi ha cap fenomen físic que produeixi un transport net d'aquesta espècie formal.

Per tant,  $c_{\text{L}}$  varia al llarg de la capa de difusió entre  $c_{\text{T,L}}^*$  a la superfície de l'elèctrode i  $c_{\text{L}}^*$  al si de la solució, com es pot veure en les figures 8.4a o 8.4c (de fet, els perfils de concentració desenvolupats en el període  $t_0 < t < t_d$  en NPP sense adsorció són idèntics als

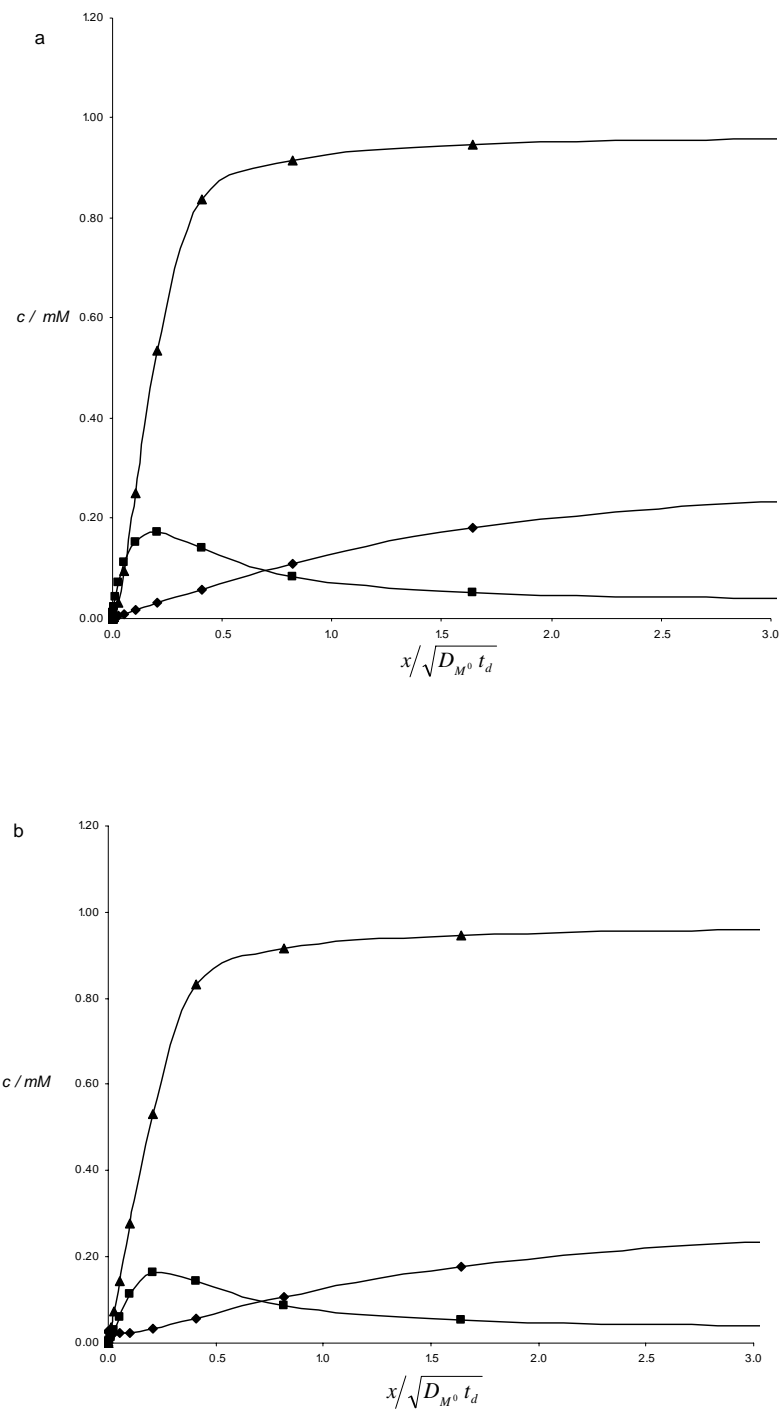


Figura 8.7.- Perfils de concentració de M (♦), ML (▲) i L (■) en RPP amb adsorció de lligand i complex. (a) i (b) corresponen a  $t = t_0$  i  $t = t_d$  respectivament, amb  $c_{T,M}^* / c_{T,L}^* = 1.2$ ,  $K_{ML} = K_L = 10^5 \text{ mM}^{-1}$ ,  $K = 10^4 \text{ mM}^{-1}$  i la resta de paràmetres com en la figura 8.6.

desenvolupats abans de  $t_0$  en RPP), que fa que  $D(x,t)$  quedi acotat per

$$\bar{D} < D(x,t) < D^* \quad (8.9)$$

on

$$D^* \equiv \frac{D_M + D_{ML} K c_L^*}{1 + K c_L^*} \quad (8.10)$$

correspon a  $D(\infty, t)$  per qualsevol  $t$  i

$$\bar{D} \equiv \frac{D_M + D_{ML} K c_{T,L}^*}{1 + K c_{T,L}^*} \quad (8.11)$$

que correspon a  $D(0, t)$  per qualsevol valor de  $t$ .

#### 8.4.1 Aproximació d'excés de lligand

Si en l'equació (8.7) usem  $\bar{D}$  en lloc de  $D(x,t)$ , el que significaria que hem reemplaçat  $c_L(x,t)$  per  $c_{T,L}^*$  en l'equació (8.8), es troba l'expressió simple (8.3). Aquesta expressió pel corrent infravalora el corrent actual, ja que el perfil de concentració de lligand suposat s'ha incrementat respecte el real, i això fa que es modifiqui el transport involucrant més complex (l'espècie més lenta) i disminuint l'aportació del metall lliure al transport.

#### 8.4.2 Aproximació bulk

Si fem servir  $D^*$  en lloc de  $D(x,t)$ , el que vol dir que  $c_L(x,t)$  s'ha substituït per  $c_L^*$ , tenim

$$\phi \approx \phi^* \equiv \sqrt{\frac{D^*}{D_M}} = \sqrt{\frac{1 + \varepsilon K c_L^*}{1 + K c_L^*}} \quad (8.12)$$

que es pot considerar una cota superior pel corrent normalitzat.

#### 8.4.3 Aproximació ponderada

És d'esperar que la millor aproximació pel corrent vingui donada per algun valor intermedi de  $D$  entre  $\bar{D}$  i  $D^*$ . Exigirem que qualsevol aproximació nova convergeixi cap a les

expressions corresponents en els cassos límits  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$  (excés de lligand) i  $c_{T,M}^* \rightarrow \infty$  (només hi ha metall lliure en solució). Proposem ponderar els pesos de  $\bar{D}$  i  $D^*$  en termes de les concentracions “bulk” de les espècies que contenen metall ( $c_{ML}^*$  i  $c_M^*$ ), degut al seu caràcter electroactiu,

$$D_{w,M} \equiv \frac{K c_L^*}{1 + K c_L^*} \bar{D} + \frac{1}{1 + K c_L^*} D^* = \frac{c_{ML}^*}{c_{T,M}^*} \bar{D} + \frac{c_M^*}{c_{T,M}^*} D^* \quad (8.13)$$

on el pes de  $\bar{D}$  predomina quan ens acostem a la condició d'excés de lligand, mentre  $D^*$  predomina quan  $c_M^*$  no és massa baix.

El corrent límit aproximat es pot escriure de manera similar a les equacions (8.3) i (8.12) com:

$$\phi \approx \phi_{w,M} \equiv \sqrt{\frac{D_{w,M}}{D_M}} \quad (8.14)$$

La Fig. 8.8 mostra els valors de  $\phi$  amb les expressions aproximades (8.12) i (8.14) junt amb els càlculs numèrics exactes. Aquests gràfics són vàlids per NPP i RPP sense adsorció, però per simplicitat ens referirem als temps característics com els d'un experiment NPP. Les expressions (8.12) i (8.14) reproduïxen la dependència de  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$  amb bona precisió. El comportament de les desviacions de (8.12) i (8.14) dels valors exactes es pot entendre a partir del perfil de concentració del lligand. Com ja hem comentat, després de  $t_0$ , el perfil de concentració del lligand decreix monòtonament des de  $c_{T,L}^*$ , a la superfície de l'elèctrode fins  $c_L^*$  al si de la solució. Per tant,  $c_{ML}^*$  correspon a la diferència entre els dos valors extrems. Com que l'expressió aproximada suposa un perfil pla per  $c_L(x,t)$ , com més petit sigui  $c_{ML}^*$ , millor serà la concordança entre les expressions aproximades i els resultats

exactes.

Si el valor de  $c_{T,M}^*$  és fix,  $c_{ML}^*$  augmenta quan augmenta  $c_{T,L}^*$ ; per tant, s'obtidran discrepàncies més grans pels valors de  $\phi_{w,M}$  respecte els valors reals de  $\phi$  (compareu les línies contínues i discontinües de les corbes c amb les a de la Fig. 8.8). En qualsevol cas, l'augment de  $c_{ML}^*$  està fitat per  $c_{T,M}^*$ , així com les discrepàncies entre  $\phi$  i  $\phi_{w,M}$ . Per valors prou grans de  $c_{T,L}^*$ , s'assoliran les condicions d'excés de lligand i les expressions aproximades tendeixen cap als valors exactes donats per l'equació (8.3).

Considerem un valor fix de  $c_{T,L}^*$ . En el límit  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ , no hi ha  $c_{ML}^*$  i  $\phi_{w,M}$  és exacte i dona  $\bar{\phi}$ . Si  $c_{T,M}^*$  augmenta, també ho fa  $c_{ML}^*$  i l'error. Com abans, posteriors increments de  $c_{T,M}^*$  no impliquen augments significatius de  $c_{ML}^*$  ja que està afitat per  $c_{T,L}^*$ . Aleshores, l'error relatiu disminueix degut al procés de normalització consistent en dividir pel corrent corresponent a un increment continu de  $c_{T,M}^*$ .

Ens interessa particularment la millor expressió aproximada en la regió més sensible de  $\phi$  respecte de  $K$ . Com que les expressions aproximades  $\phi^*$  i  $\phi_{w,M}$  depenen de les concentracions "bulk", i com els valors "bulk" estan determinats per  $K c_{T,L}^*$  i  $K c_{T,M}^*$ , el valor de  $K$  no és rellevant. Els resultats per una constant d'estabilitat permeten contrastar la precisió de qualsevol expressió aproximada (expressió (8.12) o (8.14)) per qualsevol  $K$ . La Fig. 8.8 mostra que  $\phi_{w,M}$  dona els valors més aproximats quan  $K c_{T,L}^* = 1.715$ , per tot el rang del gràfic  $\phi$  vs  $c_{T,M}^*$ , mentre l'exactitud de  $\phi_{w,M}$  disminueix per una concentració total de lligand molt alta, cas en el que el valor límit de  $\phi$  per  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$  és proper a  $\varepsilon^{1/2}$ .



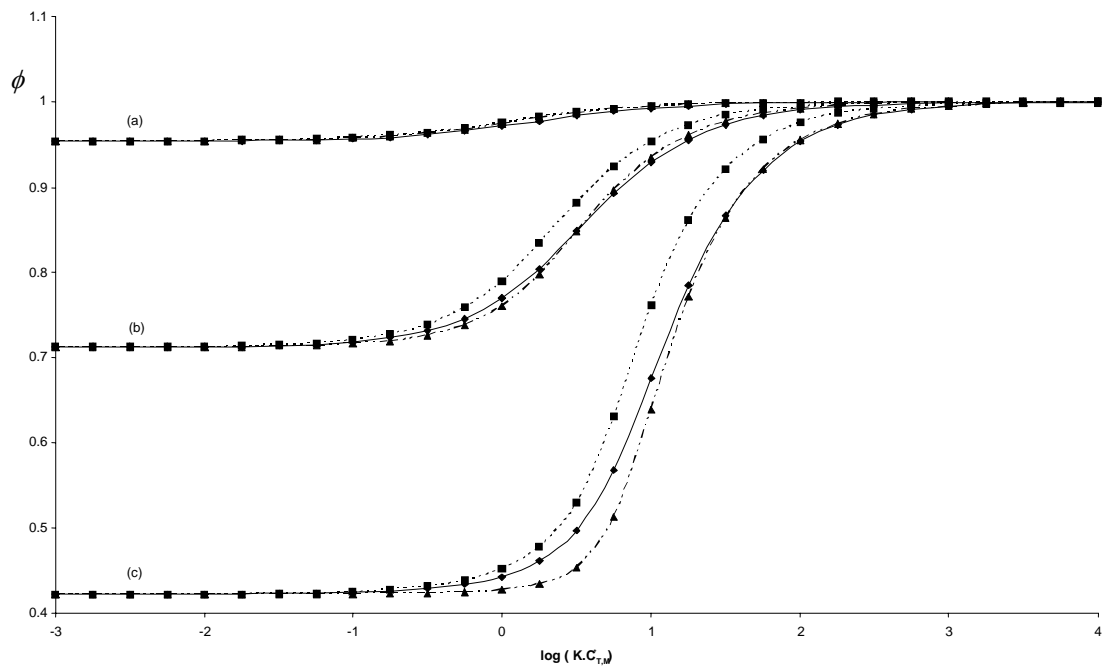


Figura 8.8: Gràfiques de  $\phi$  vs.  $\log(K c_{T,M}^*)$  per diferents valors de  $K c_{T,L}^*$ . Els paràmetres usats són:  $D_M = 7.3 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$ ,  $D_{ML}=D_L=10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  i  $K c_{T,L}^* = 10^{-1}$  (a),  $K c_{T,L}^* = 1.715$  (b) i  $K c_{T,L}^* = 5$  (c). Les línies contínues i els marcadors ( $\blacklozenge$ ) indiquen els càlculs exactes; les discontinues indiquen expressions aproximades: ( $\blacksquare$ )  $\phi^*$  obtingut amb l'expressió (8.12) i ( $\blacktriangle$ )  $\phi_{w,M}$  donada per l'expressió (8.14). La resta de paràmetres com en la figura 8.1a.

Així, l'expressió (8.14) es podria utilitzar com una ajuda per ajustar o extrapolar els valors  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$  quan  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ , cada cop que les dades disponibles (degut a la combinació dels valors de  $c_{T,M}^*$  i  $K$ ) no han assolit la zona horitzontal de la part esquerra de la gràfica.

El procés d'extrapolació suggerit consisteix en minimitzar la suma dels quadrats de les diferències entre els valors experimentals de  $\phi$  i els corresponents determinats mitjançant l'expressió (8.14) per optimització del valor de  $K$ . Així, en aquest procés d'optimització s'ajusta  $K$  directament i, simultàniament, s'obté un valor de  $\bar{\phi}$  extrapolat. L'aplicació de l'expressió de l'excés de lligand (8.3) a aquest valor de  $\bar{\phi}$  ens portarà també al mateix valor de  $K$ .

## 8.5 Aplicació als sistemes Zn-PMA i Cd-PMA

### 8.5.1 Reactius i instrumentació

L'àcid polimetacrílic (PMA) es va obtenir de BDH, amb una massa molar promig de 26000 g mol<sup>-1</sup> (segons BDH), i un coeficient de difusió proper a  $1.5 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (24). Es van preparar solucions stock de *ca.* 0.1 M (en unitats monomèriques) per dilució, i el nombre total de grups carboxílic es va determinar per titulació àcid - base conductimètrica. Les solucions de PMA es van guardar a les fosques i a 4 °C per prevenir-ne la descomposició.

La resta de reactius utilitzats eren de la casa Merck de grau analític. Les solucions stock de Zn(II) i Cd(II)  $10^{-2}$  M es van preparar a partir de Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4(H<sub>2</sub>O) i de Cd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4(H<sub>2</sub>O). El coeficient de difusió del ió metàl·lic no complexat és aproximadament  $10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (25). Es va usar KOH per la neutralització parcial de les solucions de poliàcid. Com electròlit suport de les solucions de Zn(II) i Cd(II) es va usar KNO<sub>3</sub> i un tampó de succinat respectivament. Es va utilitzar en tots els experiments aigua filtrada d'ultrapuresa (sistema de purificació d'aigua Milli-Q plus 185). Totes les mesures es van realitzar a 25 °C, i es va usar nitrogen purificat per desairejar i cobrir les mostres.

Les mesures polarogràfiques es van fer amb un equip Autolab System (Eco Chemie) connectat a un Metrohm 663 VA Stand i a un ordinador personal mitjançant el paquet de software GPES4 (Eco Chemie). El sistema també estava connectat a un Metrohm 665 Dosimat, per les addicions manuals o automàtiques de solució de lligand, i a un pHmetre Orion SA 720 pH-meter per monitoritzar els valors del pH durant l'experiment. En tots els casos, l'elèctrode de referència era el de Ag | AgCl | 3 M KCl i el contraelèctrode era un elèctrode de carbó vitrificat. L'elèctrode de treball per a les mesures polarogràfiques era un elèctrode de gota estàtica de mercuri (SMDE).

---

Els paràmetres instrumentals usats en les titulacions NPP i RPP van ser els següents: temps de la gota 0.8 s, amplitud del pols de 50 ms i superfície de la gota de  $0.52 \cdot 10^{-6} \text{ m}^2$  (“drop size 3” en la configuració del Metrohm), mentre no s’indiqui una altra. Es van usar cel·les de vidre (facilitades originalment per Metrohm) en tots els experiments perquè no s’esperaven problemes d’adsorció sobre les parets de les cel·les en les condicions experimentals utilitzades(26).

Les titulacions conductimètriques de les solucions de PMA es van dur a terme a  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  amb un conductímetre Orion 120 acoblat a un Metrohm 665-Dosimat.

### 8.5.2 Valoracions voltamètriques

S’omplia la cel·la amb solucions de  $\text{KNO}_3$  o tampó succinat de concentració fixa i s’ajustava el pH al valor desitjat afegint KOH o  $\text{HNO}_3$ . Llavors, s’enregistraven els voltamperogrames per obtenir el valor del corrent ( $I_0$ ) sense PMA per cada addició de ió metàl·lic. Després, s’ajustava amb una recta la gràfica dels valors experimentals de  $I_0$  vs.  $c_{T,M}^*$ . Finalment, es repetia el mateix procediment, però afegint una concentració fixa de PMA al  $\text{KNO}_3$  o al tampó succinat. L’enregistrament d’aquests voltamperogrames portava a un nou conjunt de dades de corrent ( $I$ ). Els valors de  $\phi$  es calculaven dividint pels valors del corrent al mateix valor de concentració de metall total.

La constant de complexació del PMA és especialment sensible a la concentració del contraió (27) i al valor del pH(28). Per això, tots els experiments es van dur a terme a una força iònica constant de 0.01 M (en el sistema Zn/PMA) o *ca.* 0.0124 M (en el sistema Cd/PMA). Per altra banda, amb el tampó succinat es va portar el pH a un valor de 6 (valor que assegurava un grau de dissociació  $\alpha_d$  de 0.35 pel PMA). En el cas del Zn(II) no va ser

necessari usar cap dissolució amortidora.

### 8.5.3 Tractament de les dades

Els voltamperogrames es van suavitzar i mesurar mitjançant el software GPES4 i diversos programes implementats en MATLAB(29). Per les dades de les valoracions NPP i RPP es va usar el programa d'anàlisi no lineal de dades ENZFITTER (30) per ajustar el valor de la constant d'estabilitat a partir de les gràfiques experimentals de  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$  a un valor fix de  $\varepsilon$  ( $\varepsilon = 0.06$  o  $0.05$  en el cas del Zn(II) o de Cd(II), respectivament).

### 8.5.4 Resultats i discussió

Els resultats experimentals pel sistema Zn-PMA 0.01 M en KNO<sub>3</sub> i Cd-PMA 0.005 M en tampó succinat, tots dos a un pH aproximadament 6, es mostren en les Figs. 8.9a i 8.10a, respectivament.

Sistema experimental	$c_{T,L}^*/\text{mM}$	$\bar{\phi}$	$K/\text{mM}^{-1}$	$K_{average}/\text{mM}^{-1}$
Zn (II) / PMA	0.125	0.604±0.003	16.7 ± 0.3	15.8± 0.8
	0.250	0.507±0.004	15.1 ± 0.4	
	0.500	0.408±0.002	15.6 ± 0.3	
Cd (II) / PMA	0.098	0.579±0.001	23.7 ± 0.1	21 ± 2
	0.197	0.472±0.004	22.8 ± 0.6	
	0.295	0.430±0.003	20.5 ± 0.5	
	0.450	0.387±0.001	18.9 ± 0.2	
	0.591	0.347±0.002	21.2 ± 0.4	

Taula 8.1: Valors de les constants d'estabilitat i  $\phi$  límit en condicions d'excés,  $\bar{\phi}$ , pels sistemes experimentals Zn/PMA i Cd-PMA, obtinguts a pH ca. 6 en KNO<sub>3</sub> 0.01 M i tampó succinat, respectivament.

Cada punt, en aquestes figures, correspon a la mitjana de tres rèpliques experimentals independents, cosa que permet disposar d'una estimació de la variància en cada punt. Com

pel sistema Zn-PMA no s'ha trobat cap referència de possible adsorció, els corrents límits s'han obtingut mitjançant la tècnica NPP, mentre que pel sistema Cd-PMA s'ha utilitzat RPP, ja que aquest sistema presenta adsorció, com s'ha indicat clarament en la literatura(5,6).

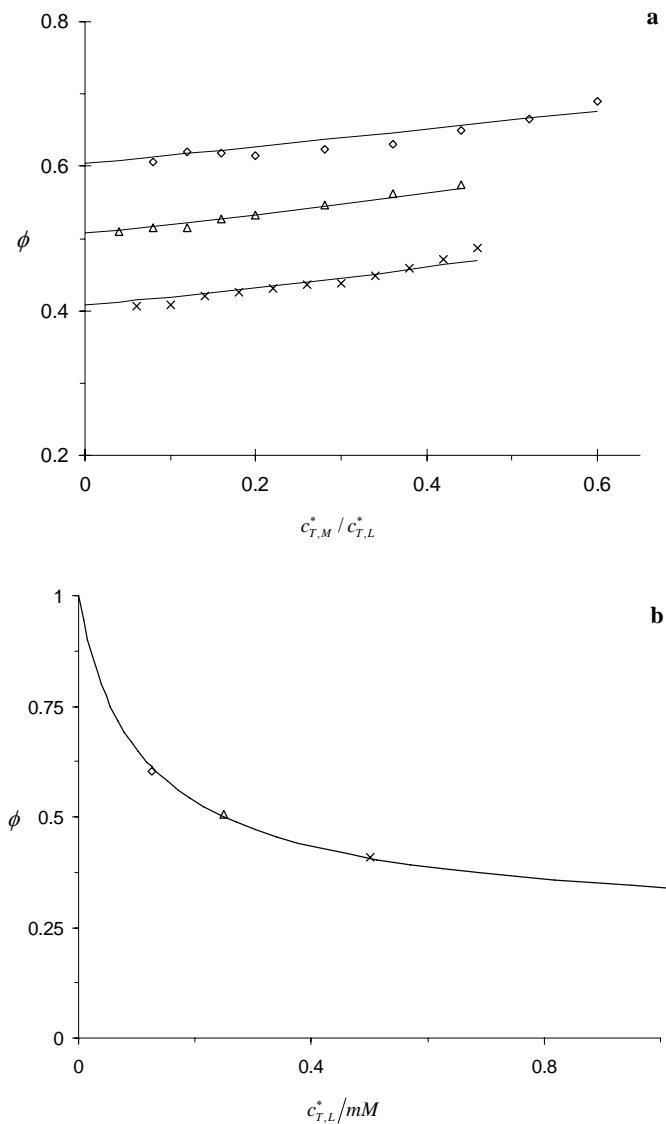


Figura 8.9: Efecte de la concentració total de lligand en les corbes de calibració normalitzades obtingudes per valoració NPP pel sistema Zn(II)/PMA. Paràmetres usats:  $t_d = 0.8$ s,  $t_p = 50$ ms,  $A = 0.52 \cdot 10^{-6}$  m<sup>2</sup>, pH = 6, força iònica (KNO<sub>3</sub>) = 0.01M i  $c_{T,L}^* = 0.125$  mM ( $\diamond$ ),  $c_{T,L}^* = 0.250$  mM ( $\Delta$ ) i  $c_{T,L}^* = 0.500$  mM ( $\times$ ).

L'objectiu dels dos sistemes experimentals és il·lustrar l'aplicació de les expressions

d'extrapolació/ajust indicats en l'apartat 4 d'aquest capítol. En el cas del sistema Cd – PMA, la determinació de  $K$  resultarà afectada (dins del límits indicats en la secció 3.2) per l'efecte de l'adsorció de lligand.

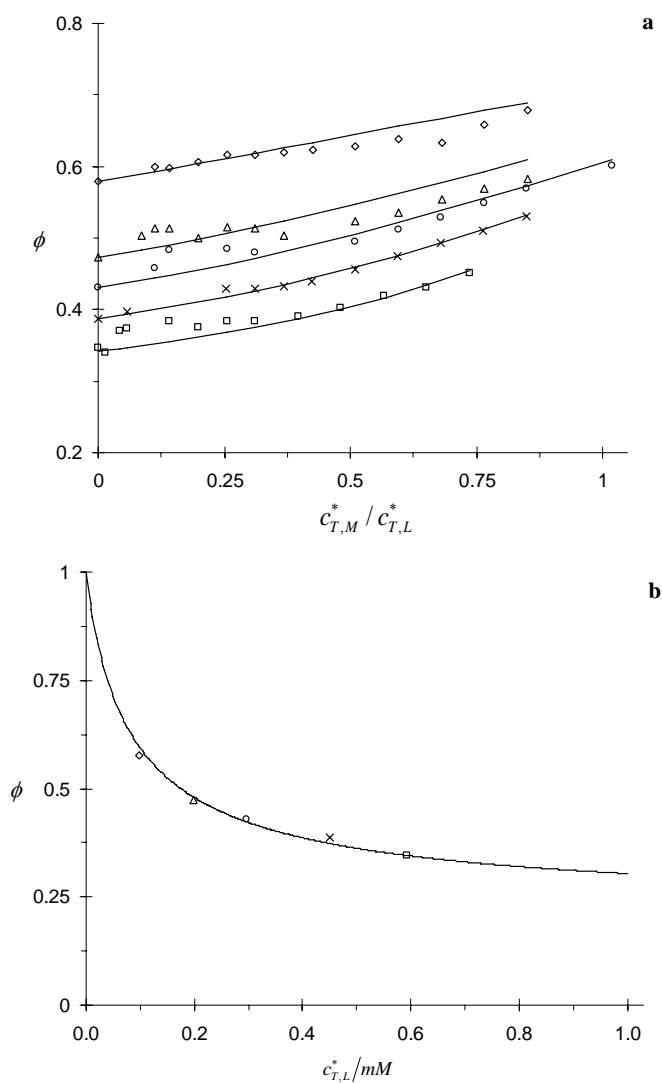


Figura 8.10: Efecte de la concentració total de lligand en les corbes de calibració normalitzades obtingudes per valoració RPP pel sistema experimental Cd(II)/PMA. Paràmetres usats:  $t_d = 0.8\text{s}$ ,  $t_p = 50\text{ms}$ ,  $A = 0.52 \cdot 10^{-6} \text{m}^2$ ,  $\text{pH} = 6$ , força iònica (tampó succinat de potassi) =  $0.01\text{M}$  i  $c_{T,L}^* = 0.985 \text{mM}$  ( $\diamond$ ),  $c_{T,L}^* = 0.197 \text{mM}$  ( $\Delta$ ),  $c_{T,L}^* = 0.295 \text{mM}$  ( $\circ$ ),  $c_{T,L}^* = 0.591 \text{mM}$  ( $\times$ ) i  $c_{T,L}^* = 0.450 \text{mM}$  ( $\square$ ).

Les desviacions respecte la teoria de l'excés de lligand (caracteritzada per la independència

---

de  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$ ) es reconeixen clarament en els dos cassos. Per tant, per ajustar les corbes  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*/c_{T,L}^*$  (línies contínues en les figures 8.9a i 8.10a) s'usa l'expressió aproximada (8.14), que permet la determinació de  $K$  juntament amb el valor extrapolat del corrent normalitzat en condicions d'excés ( $\bar{\phi}$ ). Els resultats obtinguts pels sistemes Zn-PMA i Cd-PMA en els condicions experimentals mencionades anteriorment es mostren en la Taula 1. En el cas del sistema Cd-PMA els valors de la constant d'estabilitat no s'han corregit pels coeficients de la reacció lateral de complexació del Cd(II) amb el tampó succinat.

Prenent el valor de  $K$  com la mitjana dels valors de  $K$  obtinguts en les sèries corresponents, la teoria d'excés de lligand porta a les corbes contínues mostrades en les Figs. 8.9b i 8.10b. Els valors extrapolats de les sèries en les figures 8.9a i 8.10a ( $\bar{\phi}$ , s'inclou amb marcadors en el gràfic) apareixen satisfactòriament propers als de la corba d'excés de lligand.

## 8.6 Conclusions

La implementació del Mètode d'Elements Finites de Galerkin (GFEM) permet el càlcul dels corrents límit en un sistema de complexació làbil per qualsevol relació de metall a lligand, amb i sense adsorció. Així, de l'estudi dels perfils de concentració se'n pot extreure una interpretació més profunda i acurada del fenomen.

Per qualsevol relació de metall a lligand i sense adsorció, els corrents límit NPP i RPP no difereixen. Per tant, es poden usar les expressions més senzilles desenvolupades pel corrent límit NPP per interpretar els resultats obtinguts amb ambdues tècniques..

Els corrents límit RPP redueixen l'impacte de l'adsorció, assolint el mínim impacte quan  $c_{T,M}^* \rightarrow 0$  (condicions d'excés). Els corrents límit RPP no es veuen afectats per la influència de l'adsorció del complex, mentre que l'adsorció de lligand afegeix un error addicional en

---

la determinació de la constant d'estabilitat que depèn de  $\varepsilon$ . Un error addicional del 14% es dona quan  $D_M = 20 D_L$ , que és una relació raonable entre els coeficients de difusió en sistemes macromoleculars.

Se suggereix que els gràfics  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$  es poden usar com a bons indicadors per detectar l'acompliment de les condicions d'excés de lligand. Es presenten expressions aproximades per aquestes gràfiques. Es poden usar per obtenir  $\bar{\phi}$  o  $K$  en les situacions en les que les concentracions més baixes de metall total disponibles no siguin suficients per assolir la regió plana en la que resulten d'aplicació les condicions d'excés de lligand. S'ha analitzat la precisió d'aquestes expressions.

Per fer un test de l'aplicabilitat experimental de la metodologia desenvolupada s'han utilitzat els sistemes Zn/PMA i Cd/PMA. S'ha obtingut una bona concordança entre els valors de les constant d'estabilitat obtingudes fitant les gràfiques  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$  per diferents valors de la concentració total de lligand. El valor promig de  $K$  trobat d'aquesta manera, usant les expressions d'excés de lligand, també reproduïx satisfactòriament el valor límit  $\phi$  obtingut per extrapolació de les gràfiques de  $\phi$  vs.  $c_{T,M}^*$ .

## 8.7 Referències

1. Buffle, J. *Complexation Reactions in Aquatic Systems. An Analytical Approach.*, Ellis Horwood Limited: Chichester, 1988.
2. Mota, A. M.; Correia dos Santos, M. M. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; pp 205-258.



3. van Leeuwen, H. P.; Holub, K.; DeJong, H. G. Voltammetry of Metal-Complex Systems with Different Diffusion- Coefficients of the Species Involved .4. Simulation of the Limiting Current for Any Metal-to-Ligand Ratio and Elaboration to Voltammetric Titration Curves. *J.Electroanal.Chem.* **1989**, *260*, 213-220.
4. Puy, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Cecília, J.; Diaz-Cruz, M. S.; Esteban, M.; Mas, F. Voltammetry of labile metal macromolecular systems for any ligand-to-metal ratio, including adsorption phenomena - The role of the stability constant. *J.Electroanal.Chem.* **1994**, *374*, 223-234.
5. Mas, F.; Puy, J.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; Casassas, E. Induced reactant adsorption in Normal Pulse Polarography of labile metal polyelectrolyte systems .1. Study of current potential relationship assuming potential-independent adsorption parameters. *J.Electroanal.Chem.* **1992**, *326*, 299-316.
6. Puy, J.; Mas, F.; Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; Casassas, E. Induced reactant adsorption in metal-polyelectrolyte systems - Pulse polarographic study. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *268*, 261-274.
7. van Leeuwen, H. P. In *Environmental particles*; Buffle, J., van Leeuwen, H. P., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, 1992; pp -
8. Galceran, J.; Rene, D.; Salvador, J.; Puy, J.; Esteban, M.; Mas, F. Reverse Pulse Polarography of labile metal + macromolecule systems with induced reactant adsorption - Theoretical analysis and determination of complexation and adsorption parameters. *J.Electroanal.Chem.* **1994**, *375*, 307-318.
9. Pinheiro, J. P.; Mota, A. M.; Gonçalves, M. L. S. S. Voltammetry of labile heterogeneous complexes with low diffusion coefficients. *J.Electroanal.Chem.* **1996**, *402*, 47-55.
10. Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F. Numerical procedures in electrochemical simulation. *Int.J.Quantum Chem.* **1994**, *51*, 357-367.
11. Garcés, J. L.; Mas, F.; Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J. Interpretation of speciation measurements on labile metal-macromolecular systems by voltammetric techniques. *Analyst.* **1996**, *121*, 1855-1861.
12. Garcés, J. L.; Mas, F.; Puy, J.; Galceran, J.; Salvador, J. Use of activity coefficients for bound and free sites to describe metal-macromolecule complexation. *J.Chem.Soc.Faraday Trans.* **1998**, *94*, 2783-2794.
13. Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Cecília, J.; Esteban, M.; Mas, F. Influence of adsorption on calibration curves in Normal Pulse Polarography. *Anal.Chim.Acta* **1995**, *305*, 273-284.

14. Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F.; van Leeuwen, H. P. Basis of the voltammetric analysis of labile metal-homofunctional macromolecule complexation. *J.Electroanal.Chem.* **1995**, *391*, 29-40.
15. van Leeuwen, H. P. Voltammetric Titrations Involving Metal-Complexes - Effect of Kinetics and Diffusion-Coefficients. *Sci.Total Envir.* **1987**, *60*, 45-55.
16. Presa, MJ R.; Catoggio, J. A.; Posadas, D.; Tucceri, R. I. Determination of the complexation capacity. Electrochemical lability in the absence of excess of ligand. *J.Electroanal.Chem.* **1997**, *432*, 229-235.
17. Hughes, T. J. R. *The Finite Element Method*, Prentice Hall: Englewood Cliffs, N.J., 1987.
18. Puy, J.; Torrent, M.; Monné, J.; Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Garcés, J. L.; Mas, F.; Berbel, F. Influence of the adsorption phenomena on the NPP and RPP limiting currents for labile metal-macromolecular systems. *J.Electroanal.Chem.* **1998**, *457*, 229-246.
19. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 1980.
20. Galceran, J.; Cecília, J.; Salvador, J.; Monné, J.; Torrent, M.; Companys, E.; Puy, J.; Garcés, J. L.; Mas, F. Voltammetric currents for any ligand-to-metal concentration ratio in fully labile metal-macromolecular complexation. Easy computations, analytical properties of the currents and a graphical method to estimate the stability constant. *J.Electroanal.Chem.* **1999**, *472*, 42-52.
21. Puy, J.; Salvador, J.; Galceran, J.; Esteban, M.; Díaz-Cruz, J. M.; Mas, F. Voltammetry of labile metal-complex systems with induced reactant adsorption - Theoretical analysis for any Ligand-to- Metal Ratio. *J.Electroanal.Chem.* **1993**, *360*, 1-25.
22. Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F.; Gimenez, D.; Esteban, M. Amalgamation effects in reverse pulse polarography at spherical electrodes. Influence on speciation measurements. *J.Electroanal.Chem.* **1998**, *442*, 151-167.
23. VandenHoop, M. A. G. T.; Leus, F. M. R.; van Leeuwen, H. P. Stripping Voltammetry of Zinc Polyacrylate Complexes - Influence of Molar Mass. *Collect.Czech.Chem.Comm.* **1991**, *56*, 96-103.
24. Cleven, R. F. M. J. Agricultural University, Wageningen, 1984.
25. Heyrovský, J.; Kuta, J. *Principles of Polarography*, Academic Press: New York, 1966.
26. Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; VandenHoop, M. A. G. T.; van Leeuwen, H. P. Stripping Voltammetry of Metal-Complexes - Interferences from Adsorption Onto Cell Components.

---

*Anal.Chem.* **1992**, *64*, 1769-1776.

27. Díaz-Cruz, J. M.; Arino, C.; Esteban, M.; Casassas, E. Influence of the counterion concentration on the formation-constants of some metal polycarboxylate complexes - study by differential pulse anodic-stripping voltammetry. *Biophys.Chem.* **1992**, *45*, 109-117.
28. Díaz-Cruz, J. M.; Esteban, M.; VandenHoop, M. A. G. T.; van Leeuwen, H. P. Protolytic Control in Stripping Voltammetric Titrations of Metal Polyacid Complexes. *Anal.Chim.Acta* **1992**, *264*, 163-175.
29. Matlab's User Guide (computer program), Cochituate Place, MA: Mathworks; 1990
30. Leatherbarrow, R. J. *Enzfitter Manual*, Elsevier: Amsterdam, 1987.



# Capítol 9

Impacte del flux transitori  
d'assimilació en la bioacumulació.

Adsorció lineal

Part d'aquest capítol ha estat publicat a

**Marine Chemistry** 85 (2004) 89-102

## **9. Impacte del flux d'assimilació transitori en la bioacumulació. Adsorció lineal i internalització de primer ordre acoblades amb difusió esfèrica semi-infinita.**

### **9.1 Introducció**

Molts treballs experimentals en el camp de la bioassimilació de contaminants o nutrients per part de microorganismes es basen en la interpretació de les dades en termes de les teories d'estat estacionari (1-4) en les quals la cinètica considerada presenta una funció resposta independent del temps. Tanmateix, la validesa de la condició d'estat estacionari per les dades no sempre ha estat explícitament comprovada, ni ha estat derivada d'un marc matemàtic rigorós. Així, sembla oportú fer una anàlisi crítica del rang de validesa de l'opció de l'estat estacionari desenvolupant un model transitori global –encara que representi una primera aproximació simple a un problema força complex.

Un model transitori resulta clarament necessari si el flux d'assimilació mostra una certa evolució amb el temps. A mesura que els experiments d'assimilació de curta durada han esdevingut d'una rellevància i accessibilitat creixent (5-12), la consideració del flux transitori esdevindrà cada cop més tòpica, especialment per la interpretació dels gràfics experimentals en els que l'assimilació acumulativa no és una línia recta que passa per l'origen. És més, l'anàlisi de les dades transitòries proporcionen un medi per discriminar entre els processos d'adsorció i internalització. Igualment, la distinció entre influx i eflux i anàlisis més detallades del mecanisme d'internalització requereixen una interpretació rigorosa dels fluxos inicials. El coneixement del comportament del transitori resulta també necessari per entendre el temps de relaxació característic del biosistema, i.e. el temps necessari per assolir un nou estat estacionari després d'alguna pertorbació com el canvi de l'activitat de les espècies bioactives en el medi.

El model que utilitzem aquí correspon al descrit en el capítol 6, en el que s'ha explicat el desenvolupament del formalisme necessari per la modelització. Considera les tres etapes usuales: difusió, adsorció i internalització (1,11,13,14). En aquesta dinàmica no només hi està implicada la internalització, sinó també la difusió, els efectes de la qual són considerats negligibles en el Free Ion Activity Model (FIAM) (2,3,13,15). Per una dispersió diluïda d'organismes suficientment petits, amb mides per sota de  $10^{-4}$ m (16,17), el transport màssic es descriu adequadament amb difusió semi-infinita. Pel que fa a l'adsorció, el règim lineal (isoterma de Henry) permet la derivació d'expressions analítiques per les concentracions i els fluxos (18). L'aproximació de l'adsorció lineal també pot ser vàlida per un conjunt d'isotermes diferents, aplicades a setis diferents – encara que l'adsorció no vagi seguida d'internalització en alguna d'elles –, sempre i quan tots aquests setis presentin un recobriment baix en el règim lineal (vegeu secció 6.2.2.3). El tractament en aquest capítol està especialment centrat en els fluxos, ja que ells aporten la informació vital pel que fa a la velocitat d'acumulació de les espècies bioactives.

## 9.2 Modelització de la bioassimilació.

### 9.2.1 Formulació del model lineal

Com hem fet en el capítol 6, considerem l'assimilació d'una espècie química, que pot ser un ió metàl·lic, una molècula orgànica, etc., i a la que ens referirem com M. Aquesta espècie està present en el si del medi a una concentració  $c_M^*$  i suposem que l'únic mode rellevant de transport del medi cap a l'organisme és la difusió.



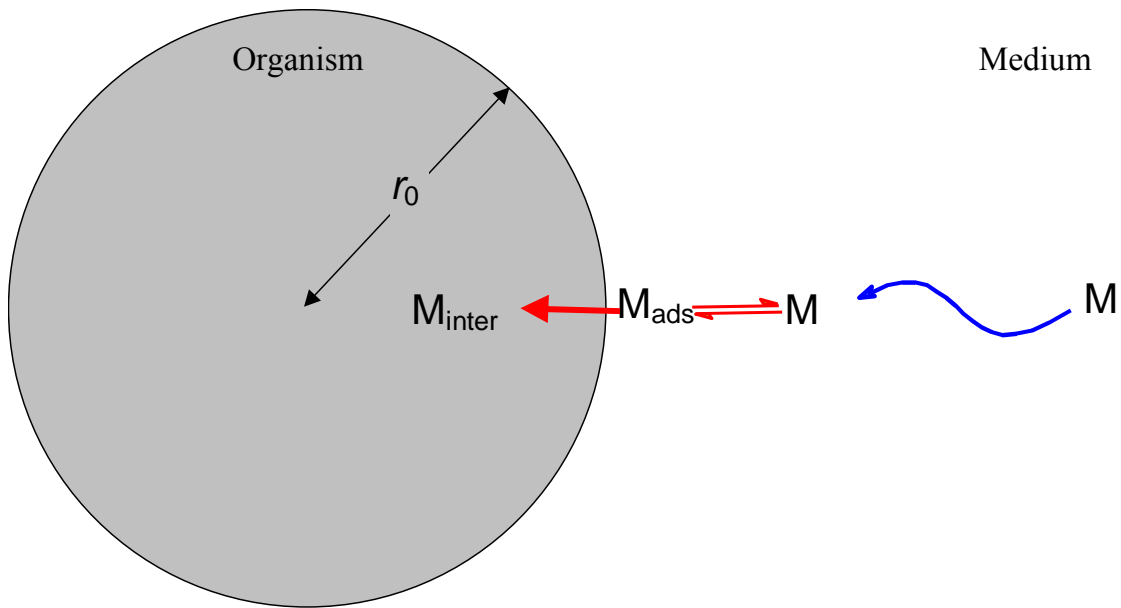


Figura 9.1: Esquema del model de bioassimilació mostrant la difusió esfèrica de l'espècie M a través del medi. A l'adsorció lineal en la superfície li segueix una cinètica d'internalització de primer ordre.

Suposem que els setis d'internalització estan ubicats en la superfície esfèrica del microorganisme o en la superfície semiesfèrica d'un domini actiu, de radi  $r_0$  (vegeu la Fig. 9.1). La conservació de la massa en el temps prescriu l'equació de difusió:

$$\frac{\partial c_M(r,t)}{\partial t} = D_M \left( \frac{\partial^2 c_M(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_M(r,t)}{\partial r} \right) \quad (9.1)$$

M es adsorbit sobre la superfície en un procés que suposem prou ràpid (comparat amb els processos de difusió i internalització) per aconseguir un equilibri local (per tant, el cassos controlats cinèticament (2,15,19) no s'analitzen aquí). Considerem el cas d'una isoterma d'adsorció lineal, i.e., una relació lineal entre la concentració superficial ( $\Gamma_M$  unitats de mol  $m^{-2}$ ) i la concentració volúmica en el medi de M, tot just fora de la capa adsorbida a la superfície de l'organisme  $c_M(r_0,t)$ :

$$\Gamma_M(t) = K_H c_M(r_0,t) \quad (9.2)$$

on  $K_H$  representa la constant d'adsorció lineal (Henry). Aquesta hipòtesi és tant més realista com més baixa sigui la concentració de M, com en el cas de les espècies traça. Per concentracions més grans de M (en comparació amb el nombre de setis d'adsorció) caldrà tenir en compte altres isoterms d'adsorció que considerin els efectes de la saturació (vegeu capítol 10).

Un cop s'ha adsorbit, suposem que M s'internalitza seguint una cinètica de primer ordre amb una constant de velocitat  $k$  (2,20). Així, la condició de contorn que es desprèn de la conservació de la massa (de M) a  $r=r_0$  es pot escriure com:

$$\frac{d\Gamma_M(t)}{dt} = K_H \frac{dc_M(r_0, t)}{dt} = D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} - k K_H c_M(r_0, t) \quad (9.3)$$

on  $k$  (en  $s^{-1}$ ) se suposa independent de la concentració superficial  $\Gamma_M$ . Les condicions de contorn restants pel transport màssic són, una concentració fixa en el si de la dissolució, (lluny de la superfície de l'organisme)

$$c_M(r, t) = c_M^* \quad r \rightarrow \infty \quad t \geq 0 \quad (9.4)$$

i una distribució inicialment homogènia de M en el medi:

$$c_M(r, t) = c_M^* \quad r \geq r_0 \quad t = 0 \quad (9.5)$$

La condició (9.4) suposa implícitament que la davallada en el si del medi és negligible (21) i que les capes de difusió de les diferents biosuperfícies actives no se solapen (22).

A més de la concentració a la superfície  $c_M(r_0, t)$ , les magnituds rellevants per caracteritzar els sistema són el flux de transport màssic que es dirigeix a la superfície,

$$J_m(t) \equiv D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} \quad (9.6)$$

i el flux d'assimilació (o d'internalització).

$$J_u(t) \equiv k \Gamma_M(t) = k K_H c_M(r_0, t) \quad (9.7)$$

Per simplicitat, s'ha assignat un signe positiu als fluxos que es dirigeixen a la superfície.

La quantitat internalitzada que s'ha acumulat (23) ve donada per la integral del flux d'assimilació respecte del temps

$$\Phi_u(t) \equiv \int_0^t J_u(t) dt \quad (9.8)$$

que representa la quantitat de matèria que s'ha internalitzat per unitat de superfície, així que  $4\pi r_0^2 \Phi_u$  dona la quantitat ingerida per cel·la (suposada esfèrica) des de l'inici del procés.

Per altra banda, el subministrament total acumulat cap a la biosuperfície  $\Phi_m$  es pot definir com

$$\Phi_m(t) \equiv \int_0^t J_m(t) dt \quad (9.9)$$

La formulació que es presenta a continuació es pot estendre, sense excessius canvis, al cas en el que M està associat, en el medi, amb algun lligand en un complex bioinactiu completament làbil (20). En aquest cas, una condició addicional simplificadora seria el cas en el que la quantitat total de lligand estigués en tal excés que la concentració de M i del complex es relacionessin linealment. En aquesta situació d'excés de lligand el coeficient de difusió efectiu és tot just una mitjana ponderada dels coeficients de difusió del complex làbil bioinactiu i del bioactiu M lliure (24,25).

### 9.2.2 A concentracions baixes, l'adsorció seguida de'internalització en qualsevol nombre de setis es pot descriure amb només dos paràmetres

Destaquem que el model lineal presentat en la secció anterior, utilitzant només dos paràmetres:  $K_H$  per l'adsorció i  $k$  pel procés d'internalització és rigorós per qualsevol nombre de setis (d'adsorció i internalització) diferents, sempre i quan cada un d'ells es descriu per una isoterma d'adsorció lineal o de Henry (a causa de la baixa concentració de  $M$ ) seguida per una cinètica de primer ordre d'internalització i tots els processos d'adsorció estiguin en equilibri. Per exemple, es fa servir amplament la distinció entre dos tipus de setis: uns actius fisiològicament (que aquí indicarem amb el subíndex 1) i uns altres de no actius (indicats amb el subíndex 2) (11,20,26). Suposant isoterms Langmuirianes per un model com aquest de dos tipus de setis, es pot escriure:

$$\frac{\Gamma_1(t)}{\Gamma_{\max,1}} = \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,1} + c_M(r_0, t)} \quad ; \quad \frac{\Gamma_2(t)}{\Gamma_{\max,2}} = \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,2} + c_M(r_0, t)} \quad (9.10)$$

on  $\Gamma_1$  i  $\Gamma_2$  indiquen les concentracions superficials associades als setis de tipus 1 i 2 respectivament (amb  $\Gamma_{\max,1}$  i  $\Gamma_{\max,2}$  com els seus valors màxims) i on  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$  representen les constants de semi-saturació per cada isoterma (i igual a la inversa de la constant habitual d'adsorció langmuiriana) (2). D'acord amb aquesta aproximació de dos tipus de setis,  $M$  només s'internalitza en els setis de tipus 1:

$$J_u(t) = k_1 \Gamma_{\max,1} \frac{c_M(r_0, t)}{K_{M,1} + c_M(r_0, t)} \quad (9.11)$$

Quan  $c_M(r_0, t) \ll K_{M,1}$  i  $c_M(r_0, t) \ll K_{M,2}$ , tots els setis segueixen isoterms lineals i la comparació de l'equació (9.10) amb (9.2) i (9.11) amb (9.7) porta a les següents equivalències:

$$K_H = \frac{\Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}} \quad (9.12)$$

$$k = \frac{k_1 \Gamma_{\max,1} K_{M,2}}{\Gamma_{\max,1} K_{M,2} + \Gamma_{\max,2} K_{M,1}} \quad (9.13)$$

entre aquests models.

En conclusió,  $K_H$  i  $k$  es poden interpretar com paràmetres efectius globals que fan la mitjana (amb els pesos apropiats) de totes les característiques d'adsorció i internalització dels diferents setis disponibles sobre la superfície de l'organisme quan la concentració de M es prou baixa. Aquesta naturalesa de promig de  $K_H$  i  $k$  les fa especialment robustes davant de canvis tals com el nombre de tipus de setis considerats.

### 9.3 Expressions pels fluxos i les quantitats acumulades

#### 9.3.1 Solució analítica per l'estat estacionari

La solució per la concentració a la superfície esfèrica a l'estat estacionari  $c_M^{SS}$  (per simplicitat s'omet la referència espacial  $r_0$ ) s'obté de l'equació (9.3) fent  $dc_M/dt = 0$

$$\frac{c_M^{SS}}{c_M^*} = \frac{1}{1 + k K_H r_0 / D_M} \quad (9.14)$$

a partir de la qual el flux difusiu a la superfície en l'estat estacionari es pot calcular com (15,27)

$$J_m^{SS} / c_M^* = D_M / (r_0 + D_M / (k K_H)) = (r_0 / D_M + 1 / (k K_H))^{-1} \quad (9.15)$$

Fent la inversa en cada costat d'aquesta expressió s'obté una interpretació de la “resistència total a l'assimilació” o “inversa de la permeabilitat”  $c_M^* / J_m^{SS}$  que es pot posar com la suma de la “resistència al transport difusiu”  $r_0 / D_M$  i la “resistència a la adsorció-internalització” o “resistència superficial”  $1 / (k K_H)$  (15,28). La disminució del radi força per sota de  $D_M / (k K_H)$  té com efecte fer desaparèixer el flux de l'estat estacionari  $J_m^{SS}$ , ja que el darrer pas ja no està controlat per la difusió, sinó que està

pels processos heterogenis (adsorció + internalització) . Per altra banda, si la parella adsorció + internalització és molt més efectiva que la difusió ( $k K_H \gg D_M/r_0$ ), aleshores  $c_M^{SS} \rightarrow 0$  i es recupera el flux límit d'estat estacionari  $J_m^*$  per un organisme esfèric:

$$J_m^* = D_M c_M^* / r_0 \quad (9.16)$$

### 9.3.2 Solucions analítiques per la concentració a la superfície i el flux transitoris

Algunes solucions obtingudes de la literatura (18,29) es poden expressar en termes de dos paràmetres auxiliars

$$\alpha \equiv \frac{\sqrt{D_M r_0} + \sqrt{D_M r_0 - 4(D_M K_H + k K_H^2 r_0)}}{2 K_H \sqrt{r_0}} \quad (9.17)$$

i

$$\beta \equiv \frac{\sqrt{D_M r_0} - \sqrt{D_M r_0 - 4(D_M K_H + k K_H^2 r_0)}}{2 K_H \sqrt{r_0}} \quad (9.18)$$

L'expressió per la concentració a la superfície  $c_M(r_0, t)$  es pot reformular aleshores com

$$\frac{c_M(r_0, t)}{c_M^*} = \frac{c_M^{SS}}{c_M^*} + \frac{\beta(D_M - \alpha r_0 \sqrt{D_M})F(\alpha\sqrt{t}) + \alpha(\beta r_0 \sqrt{D_M} - D_M)F(\beta\sqrt{t})}{\alpha\beta(\alpha - \beta)K_H r_0} \quad (9.19)$$

on

$$F(x) \equiv \exp(x^2) \operatorname{erfc}(x) \quad (9.20)$$

També es disposa de expressions analítiques exactes pel cas específic en el que  $\alpha = \beta$ .

A partir de l'equació de la concentració, l'expressió pel flux es pot obtenir directament aplicant la condició de contorn (9.3) i les definicions (9.6) i (9.7). El resultat és

$$\frac{J_m}{D_M c_M^*} = \frac{J_m^{SS}}{D_M c_M^*} + \frac{1}{\sqrt{\pi D_M t}} + \left( \frac{2\sqrt{D_M}}{r_0} - \frac{D_M}{r_0^2 \alpha} - \alpha \right) \frac{F(\alpha\sqrt{t})}{K_H(\alpha - \beta)} - \left( \frac{2\sqrt{D_M}}{r_0} - \frac{D_M}{r_0^2 \beta} - \beta \right) \frac{F(\beta\sqrt{t})}{K_H(\alpha - \beta)} \quad (9.21)$$

Utilitzant una expansió asimptòtica per F (30), es pot demostrar que la concentració a la superfície i, per tant el flux d'assimilació  $J_u$ , passa per un màxim. Per exemple, en la corba per  $k=10^{-1} \text{ s}^{-1}$  en la figura 9.2,  $c_M(r_0,t)/c_M^*$  passa per un valor màxim de aproximadament 0.0068 als voltants de quan  $t=21 \text{ s}$ , superant el valor estacionari final proper a 0.005 donat per l'equació (9.14).

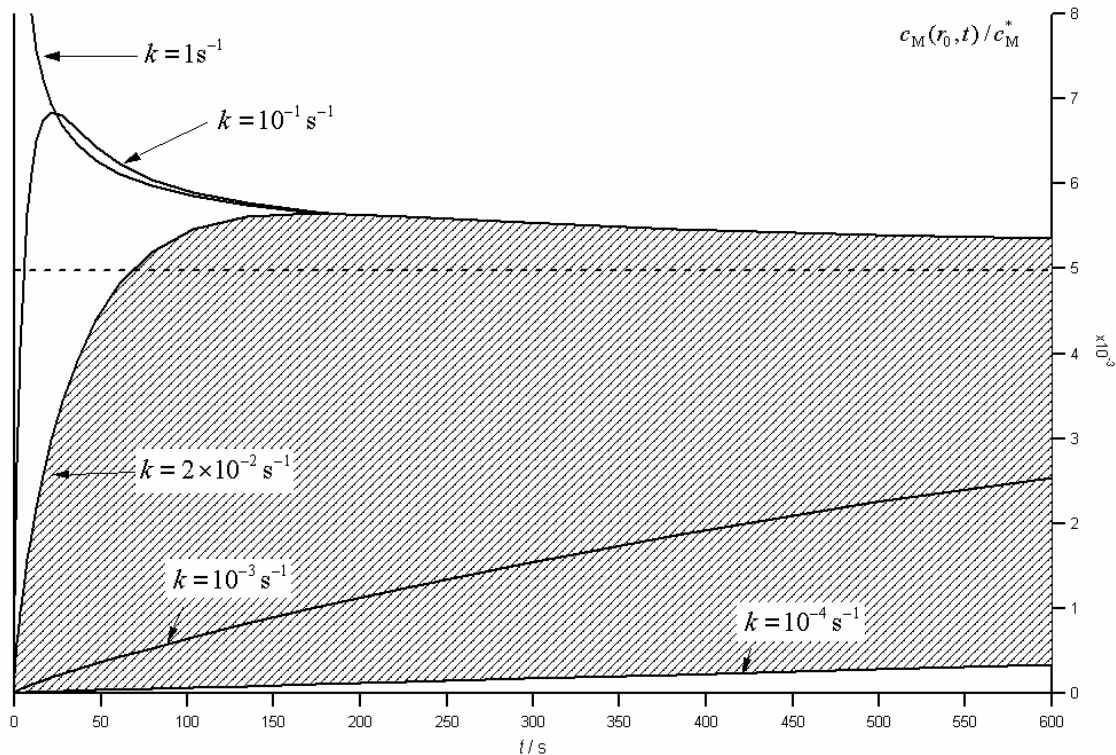


Figura 9.2: Evolució de  $c_M(r_0,t)/c_M^*$  per a cinc combinacions de  $K_H$  i  $k$  que donen un producte comú de  $2 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$  (estimat de (31)). Les corbes per  $k = 1 \text{ s}^{-1}$ ,  $k = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $k = 2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $k = 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  i  $k = 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  convergeixen cap a  $c_M^{SS}/c_M^* = 0.005$  (línea horitzontal puntejada). L'àrea ombrada correspon a un rang d'alguns valors de  $k$  donats en la literatura (5,19). Altres paràmetres:  $D_M=10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  i  $r_0=0.1 \text{ mm}$ .

L'explicació física de l'existència d'aquest màxim en l'evolució temporal de la concentració a la superfície es pot entendre a partir de la combinació dels processos de difusió, adsorció i internalització. En el límit en el que només l'adsorció és present (sense internalització o  $k=0$ ) el valor de  $c_M(r_0, t)$  cauria fins a 0 a  $t=0$  i a partir d'aquí *augmentaria* cap a  $c_M^*$  sense cap màxim. En el límit de només internalització (i.e. sense adsorció:  $K_H=0$ ), el valor de  $c_M(r_0, t)$  *decreixeria* des d'un valor inicial  $c_M^*$  fins el valor a l'estat estacionari quan la internalització es compensaria exactament amb la difusió. Quan es combinen els dos processos, l'adsorció prevaleix a temps curts (a causa de la condició d'equilibri) i  $c_M(r_0, t)$  augmenta fins un punt en el que el flux d'internalització  $J_u$  no pot ser mantingut pel flux difusiu  $J_m$  (que decreix contínuament amb  $t$  a causa de la disminució de  $M$  prop de la superfície). Efectivament, quan  $J_u=J_m$ , la condició de contorn (9.3) prescriu que  $dc_M(r_0, t)/dt = 0$ , que és la condició per un màxim. Llavors,  $c_M(r_0, t)$  comença a disminuir a  $c_M^{SS}$  perquè  $J_u > J_m$ . Aquest tipus de fenomen d'excés transitori no és inusual: també ha estat predit pel l'adsorció i internalització en geometria plana (32) i en la conversió electròdica d'un reactant afectat per una reacció química lenta precedent (25). S'han descrit excessos d'aquesta mena en experiments curts de bioassimilació, com el de la figura 1 a (7); Fig 6 a (33); Fig 2 a (34); Fig 8 a (12), encara que podrien ser deguts a la combinació de diversos fenòmens.

La rellevància que a la pràctica pot tenir l'existència d'aquest màxim depen de que la concentració corresponent sigui suficientment diferent del valor estacionari final. Per exemple, a la corba amb pic més pronunciat ( $k=1 \text{ s}^{-1}$ ) de la figura 9.2 la concentració del màxim és 2.5 vegades  $c_M^{SS}$ , mentre que per la corba amb  $k=2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  el màxim supera només en un vuitè el valor de l'estat estacionari. Per tant, el màxim pot deixar-se



d'apreciar fàcilment en els cassos en els que hi hagi una diferència petita entre el màxim i la concentració de l'estat estacionari o amb lapses de temps inadequats.

### 9.3.3 Solucions analítiques per l'assimilació acumulada

Usant els resultat previs (9.19) amb (9.7) i (9.8), es troba

$$\begin{aligned} \Phi_u(t) = & -\frac{c_M^* D_M K_H^2 k r_0 (D_M + k r_0 (K_H + r_0))}{(D_M + K_H k r_0)^3} + J_m^{SS} t + \frac{2r_0^2 (J_m^{SS})^2}{c_M^* D_M^{3/2} \sqrt{\pi}} \sqrt{t} \\ & - \frac{c_M^* k \sqrt{D_M} (\alpha r_0 - \sqrt{D_M})}{\alpha^3 (\alpha - \beta) r_0} F(\alpha \sqrt{t}) + \frac{c_M^* k \sqrt{D_M} (\beta r_0 - \sqrt{D_M})}{\beta^3 (\alpha - \beta) r_0} F(\beta \sqrt{t}) \end{aligned} \quad (9.22)$$

$\Phi_m$  pot calcular-se ja sigui per integració de (9.21) o a partir de la suma de la quantitat internalitzada i la quantitat adsorbida

$$\Phi_m(t) = \Phi_u(t) + K_H c_M(r_0, t) \quad (9.23)$$

que poden ser calculades amb les expressions (9.19) i (9.22).

Es pot observar que la representació  $\Phi_u$  vs. temps mostra un punt d'inflexió quan  $J_u$  assoleix el màxim, passant d'una forma inicial còncava a un perfil convex.

## 9.4 Evolució del flux i de l'assimilació acumulada

### 9.4.1 L'impacte del radi

La figura 9.3 mostra l'evolució dels fluxos  $J_m$  i  $J_u$  amb el temps. Com es d'esperar, el flux difusiu  $J_m$  disminueix amb el temps i tendeix cap al valor de l'estat estacionari mentre va convergint amb el flux d'internalització  $J_u$ . Per un conjunt donat de valors dels paràmetres en la figura 9.3a,  $J_u$  augmenta amb un pendent molt

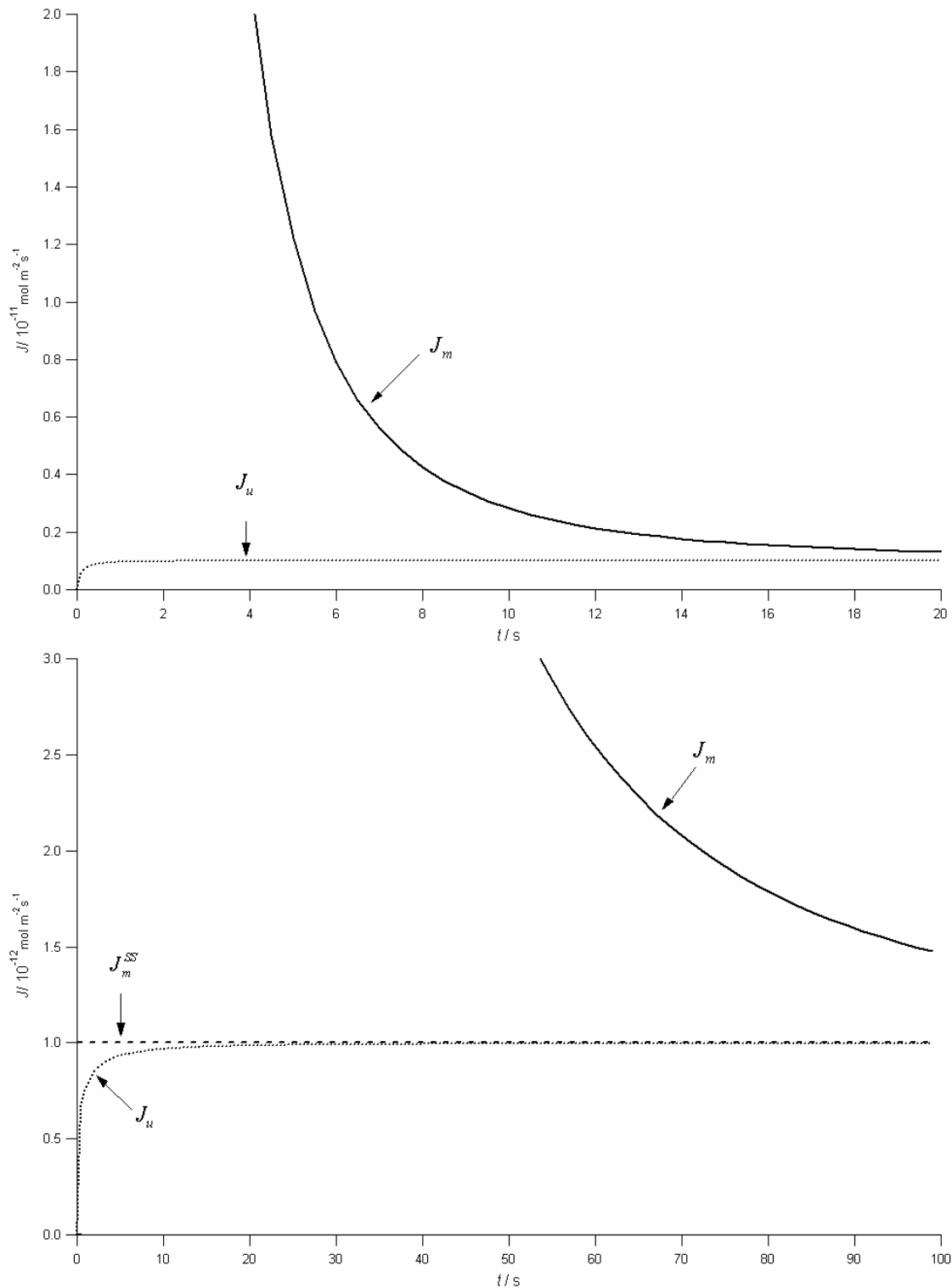


Figura 9.3 : Fluxos vs.  $t$ . La línia contínua superior correspon al flux difusiu  $J_m$ . La corba de punts inferior correspon al flux d'internalització o d'assimilació  $J_u$ . Paràmetres:  $K_H=2\cdot 10^{-5}\text{m}$ ,  $k=5\cdot 10^{-5}\text{ s}^{-1}$ ,  $D_M=10^{-9}\text{ m}^2\text{ s}^{-1}$  i  $C_M^*=10^{-3}\text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ . a): Cas amb  $r_0=10\text{ }\mu\text{m}$ . b): Lenta aproximació de  $J_m$  cap a l'estat estacionari (línia horitzontal de punts,  $J_m^{SS}$  eqn. (9.15)) per  $r_0=0.1\text{ mm}$ .

pronunciat i assoleix el 97% del seu valor de l'estat estacionari en menys de 1 s (el màxim, a  $t\approx 30,000\text{ s}$  no es veu, naturalment), mentre  $J_m$  cau per sota del 110% de  $J_m^{SS}$

després de 31 s. Canviar el radi té un impacte dramàtic en els fluxos, com es pot veure quan es comparen els panells a i b de la figura 9.3, on l'única diferència és que  $r_0$  ha augmentat des de 10  $\mu\text{m}$  fins 100  $\mu\text{m}$ . La major rapidesa de  $J_u$  per tendir a  $J_m^{\text{SS}}$  pel cas de  $r_0=10 \mu\text{m}$  pot atribuir-se a la potenciada eficiència de la difusió dels sistemes amb radis molt petits actuant a temps molt curts.

#### 9.4.2 Descomponent el producte $k \cdot K_H$

Per un sistema amb  $D_M$  i  $r_0$  coneguts, el coneixement del flux de l'estat estacionari  $J_m^{\text{SS}}$  permet determinar el valor del producte  $k \cdot K_H$  a partir de l'equació (9.15), però no els valors individuals de  $k$  i  $K_H$ . Tanmateix, els valors individuals d'aquests paràmetres influeixen en l'evolució transitòria del flux  $J_m$ . Efectivament, a la figura 9.4 es mostra com mantenint un valor fix de  $2 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$  pel producte  $k \cdot K_H$ , els fluxos transitoris augmenten dramàticament quan el valor individual de  $K_H$  augmenta de  $10^{-4} \text{ m}$  a  $0.1 \text{ m}$ . Utilitzant un conjunt diferent de paràmetres, la figura 9.2 mostra una evolució molt diferent per  $c_M(r_0, t)$  malgrat el valor comú del producte  $k \cdot K_H = 2 \times 10^{-3} \text{ m s}^{-1}$ : com més gran és  $k$ , més ràpidament la concentració s'aproxima al valor corresponent a l'estat estacionari. Per una concentració a la superfície activa d'estat estacionari fixada  $c_M^{\text{SS}}$ , es pot suggerir la següent descripció física pels paràmetres que influeixen en l'evolució de  $c_M(r_0, t)$  (26,32): l'adsorció és el procés predominant a  $t$  curt, però decau a mesura que el temps augmenta; la velocitat d'internalització és menys rellevant a temps curts, però esdevé significativa a partir d'una etapa intermèdia.

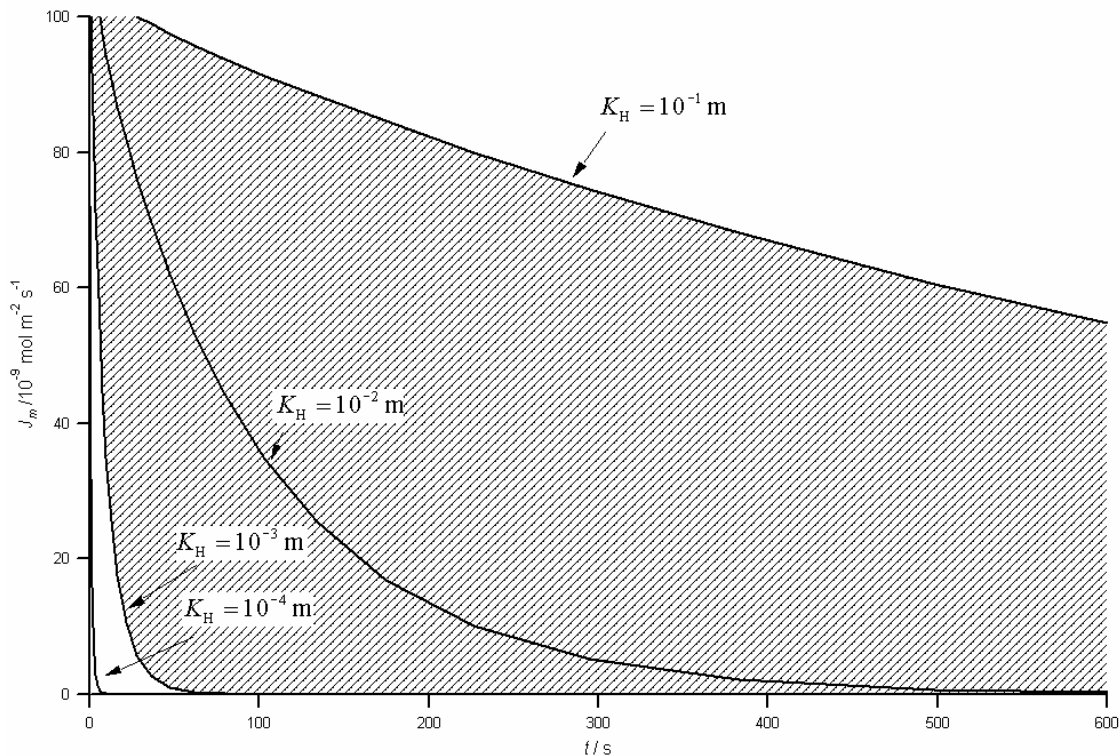


Figura 9.4 Fluxos transitoris per a quatre combinacions de  $K_H$  i  $k$  que donen un mateix producte  $2 \times 10^{-8} \text{ m s}^{-1}$ . Les línies amb  $K_H=0.1 \text{ m}$ ,  $K_H=10^{-2} \text{ m}$ ,  $K_H=10^{-3} \text{ m}$  i  $K_H=10^{-4} \text{ m}$  convergeixen cap a  $J_m^{SS} = 2 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ . L'àrea ombrada correspon a un rang de valors de  $K_H$  reportats a la literatura (11,31). Altres paràmetres com en la figura 9.3a

Com a resultat, es pot concloure que els valors individuals de  $k$  i  $K_H$  es poden trobar a partir de l'ajust del comportament transitori dels fluxos. Per exemple, es pot demostrar també que si es disposa del valor de  $J_u$  a temps molt curts, el pendent de la tangent a la corba  $J_u$  vs.  $\sqrt{t}$  en l'origen dona  $2kc_M^* \sqrt{D_M / \pi}$ .

### 9.4.3 Quan triga en assolir-se l'estat estacionari?

Com s'ha comentat en l'apartat 9.3.1, com menor és el radi, més aviat s'assoleix un quasi estat estacionari. Aquest fet dona suport al marc interpretatiu d'estat estacionari que es fa habitualment amb les dades experimentals per cèl·lules petites. Tanmateix, l'aproximació cap a l'estat estacionari pot resultar força lenta per segons quina combinació de paràmetres (vegeu la figura 9.3b) i això pot donar lloc

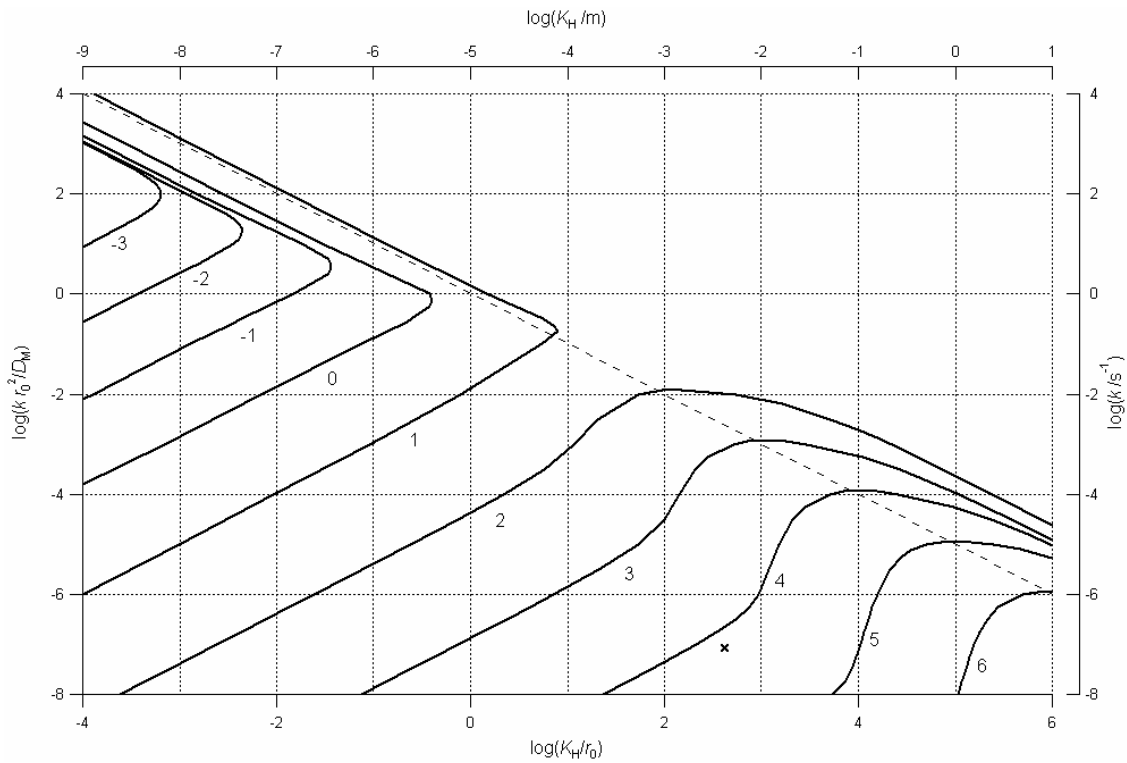


Figura 9.5: Corbes de nivell del temps adimensional ( $D_M t / r_0^2$ ) necessari perquè  $J_m$  assoleixi el valor 1.1  $J_m^{SS}$  en funció del logaritme del paràmetre d'adsorció adimensional ( $K_H / r_0$ ), en abscisses (eix inferior), i el logaritme del paràmetre d'internalització adimensional ( $k r_0^2 / D_M$ ), en ordenades (eix de l'esquerra). El número en cada corba indica el valor de  $\log(D_M t / r_0^2)$ . La diagonal (línea puntejada) correspon a  $k K_H r_0 = D_M$ . El punt assenyalat amb una creu correspon al valor dels paràmetres recuperats a partir de les dades experimentals descrites en l'apartat 9.4.5. Els eixos exteriors (dalt i dreta) corresponen al cas  $r_0=10 \mu\text{m}$ ,  $D_M=10^{-10} \text{m}^2\text{s}^{-1}$ , per tant les etiquetes en les isocorbes es poden llegir directament per aquest cas particular com a  $\log(t)$  sense cap variable adimensional.

a errors significatius en la determinació dels paràmetres característics del sistema si s'agafa incorrectament un valor transitori inapropiat com a valor d'estat estacionari final. Per exemple, després de 600 s, la concentració a la superfície per la corba  $k=10^{-4} \text{s}^{-1}$  en la figura 9.2 és encara un 7% del valor de la concentració a l'estat estacionari. A més, en la figura 9.3b el flux transitori a  $t=72 \text{s}$  encara és el doble que el veritable valor de l'estat estacionari; això comportaria un 100% d'error en la determinació del producte  $k K_H$ .

La disponibilitat d'expressions analítiques pel flux difusiu transitori  $J_m$  permet calcular el temps necessari per assolir una determinada proximitat a l'estat estacionari (35). Per tal de permetre una avaluació ràpida d'aquest temps i per aprofundir més en el problema s'ha construït en la figura 9.5 les corbes de nivell amb els temps necessaris per a que  $J_m$  difereixi un 10% de  $J_m^{SS}$ . Aquest gràfic es pot utilitzar amb qualsevol conjunt de paràmetres que s'ajustin al model, ja que es pot demostrar que tres variables adimensionals adequades són suficients per descriure el model (18). Hem triat els paràmetres adimensionals següents:  $D_M t / r_0^2$  (que podríem considerar un temps adimensional),  $K_H / r_0$  (un paràmetre d'adsorció adimensional) i  $k r_0^2 / D_M$  (un paràmetre cinètic adimensional). Com a coordenades de la figura 9.5 s'han usat els logaritmes dels paràmetres adimensionals d'adsorció i cinètic. Cada corba connecta sistemes que comparteixen el mateix temps adimensional per arribar a la condició  $J_m = 1.1 J_m^{SS}$ .

Vegem com es pot utilitzar la figura 9.5 amb les dades particulars  $D_M$  i  $r_0$  de la figura 9.3a: com els logaritmes dels paràmetres adimensionals  $K_H / r_0$  i  $k r_0^2 / D_M$  en la figura 9.3a són 0.30 i -5.30 respectivament, podem llegir en la figura 9.5 que  $\log(D_M t / r_0^2)$  val aproximadament 2.5 (el punt es troba entre les dos iso-línies etiquetades amb 2 i 3). Això implica que són necessaris aproximadament 30 s per assolir la proximitat de l'estat estacionari que hem indicat. Si els valors individuals de  $k$  i  $K_H$  no fossin coneguts, però sí el seu producte (posem  $10^{-9} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ), no tindríem un punt en el diagrama, sinó la línia  $\log\left(\frac{K_H}{r_0}\right) + \log\left(\frac{k r_0^2}{D_M}\right) = -5$ , que intercepta les corbes de nivell a valors creixents del temps adimensional si s'incrementa el valor individual de  $K_H$ .

L'observació de la figura 9.5 suggereix que, en general, l'augment de  $K_H$  retarda l'assoliment de l'estat estacionari. Això es pot entendre físicament ja que valors més grans de  $K_H$  impliquen quantitats més grans de  $M$  que han de ser transportades cap a la superfície del microorganisme, i consumint més temps. L'esquema de les isocorbes suggereix dues regions: la regió inferior esquerra, d'adsorció relativament feble i cinètica lenta, i la regió superior dreta d'adsorció relativament forta i cinètica ràpida. Aquestes dues regions estan separades per la diagonal principal (definida per  $kK_H = D_M / r_0$ ), fet que posa de manifest el paper crític que juga el producte  $k K_H$ .

Per sobre de la diagonal ( $kK_H r_0 / D_M \gg 1$ ), el temps adimensional gairebé no es mou d'un valor límit  $D_M t / r_0^2 = 100/\pi$ . Efectivament, aquest valor també es pot deduir si ens fixem que, a causa del valor gran de  $k$  i  $K_H$ , la difusió (esfèrica) acaba limitant el flux, el qual dona  $\frac{1}{\sqrt{\pi D t}} + \frac{1}{r_0} = \frac{1.1}{r_0}$  (36). Inclús, a  $K_H$  gran, la quantitat de matèria adsorbida en aquesta regió "plana" no és gran degut a que la gran velocitat d'internalització redueix considerablement el valor de  $c_M^{SS}$ .

Sota la diagonal ( $kK_H r_0 / D_M \ll 1$ ) en la figura 9.5, es pot observar que apareixen isocorbes gairebé rectes amb pendent 1 (el quocient fix dels paràmetres adimensionals d'adsorció i cinètic). Així, movent-nos en aquesta regió al llarg d'una línia amb pendent -1 (això és, paral·lela a la diagonal corresponent a un valor fix conegut del producte  $k K_H$ ) des de l'esquerra cap a la dreta augmenta el temps adimensional necessari per aproximar-se a l'estat estacionari. Això es pot entendre a causa de la gran quantitat de

M necessària pel gran valor de  $\Gamma_M$  ( $K_H c_M^{SS}$  amb un valor gran de  $K_H$  i  $c_M^{SS} \approx c_M^*$ ) sota condicions d'un valor baix de  $k$  ( $K_H$  gran i  $k$  molt petit).

En conclusió, si els paràmetres del sistema corresponen a la regió per sobre de la diagonal de la figura 9.5, és raonable utilitzar l'estimació estàndard del temps per arribar a l'estat estacionari basada en només difusió (i.e.  $t \approx r_0^2 / D_M$ ), però quan els paràmetres corresponen a la regió dreta de sota la diagonal es necessiten temps molt més grans (depenent de la importància de l'adsorció i la internalització tant com de la difusió).

#### 9.4.4 L'aproximació de l'estat estacionari instantani (ISSA, Instantaneous Steady State Approximation).

La figura 9.6a, que és similar a les figures experimentals de (5) (6,7,37,38),(11) mostra  $\Phi_m$  i  $\Gamma_M$  corresponents als fluxos representats a la figura 9.3a. Observem que per aquests paràmetres,  $\Phi_u = \Phi_m - \Gamma_M \ll \Gamma_M$  per un temps prou gran. Després d'omplir-se  $\Gamma_M$  en aproximadament 30 segons, el sistema assoleix pràcticament el règim estacionari, reflectit en el comportament lineal de  $\Phi_m$  i  $\Phi_u$  per temps més grans. Aquesta linealitat suggereix un procediment per trobar els valors individuals dels paràmetres del producte  $k K_H$ , si temps experimentals molt curts no són accessibles i no es pot distingir entre les quantitats adsorbides i internalitzades. Simplifiquem el model general tot suposant un instantani assoliment inicial de la concentració superficial  $\Gamma_M$  al valor de l'estat estacionari, seguida immediatament pel flux del règim estacionari:

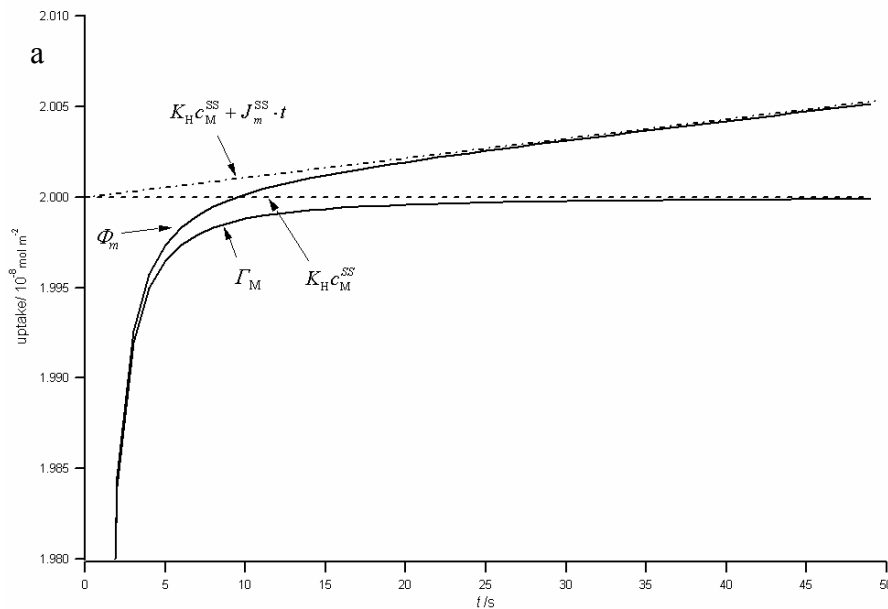
$$\Phi_m(t) \approx K_H c_M^{SS} + J_m^{SS} t \quad (9.24)$$

Ens referim a aquest model simplificat com aproximació de l'estat estacionari instantani (ISSA, Instantaneous Steady-State Approximation), com una manera de posar de



manifest explícitament les bases físiques dels fluxos transitoris subjacents a la interpretació usual de les quantitats acumulades en l'estat estacionari (11).

Com és d'esperar, les línia amb punts i guions de la figura 9.6a que representa l'equació (9.24) tendeix asimptòticament cap a  $\Phi_m$  per temps no massa petits. En el cas de la figura 9.6a, l'aproximació de l'estat estacionari instantani expressada en l'equació (9.24) és força raonable, degut al ràpid compliment del procés d'adsorció. Així, els valors de  $\Phi_m$  per temps no massa curts es podrien ajustar a una línia recta, el pendent de la qual ens donaria  $J_m^{SS}$  i l'ordenada a l'origen  $\Gamma_M^{SS} = K_H c_M^{SS} = J_m^{SS} / k$  a partir dels quals es podria aïllar  $k$  (i  $K_H$ ).



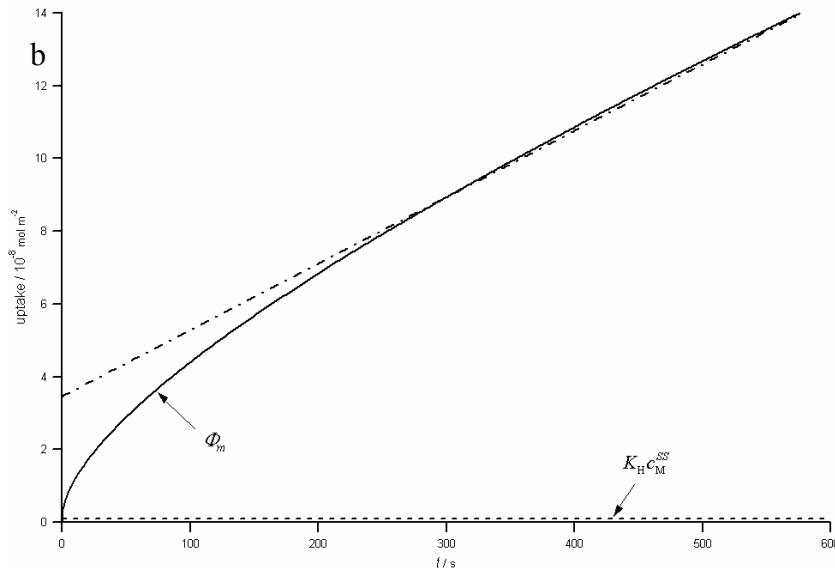


Figura 9.6: Evolució de l'acumulació total  $\Phi_m$  (veure equació (9.23)) i concentració superficial  $\Gamma_M(t) = K_H c_M(r_0, t)$ . La línia puntejada correspon a la concentració superficial a l'estat estacionari  $\Gamma_M^{SS} = K_H c_M^{SS}$ . a) amb paràmetres com en la figura 9.3a, es pot observar un comportament asimptòtic de  $\Phi_m$  en la línia amb punts i guions  $K_H c_M^{SS} + J_m^{SS} t$  (equació (9.24)). b): En un cas amb  $k = 10^{-1} \text{ s}^{-1}$ ,  $K_H = 10^{-4} \text{ m}$ ,  $D_M = 10^{-11} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^* = 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$  i  $r_0 = 0.01 \text{ cm}$ , un ajust lineal (línia de punts i guions) de valors de  $\Phi_m$  a temps relativament llargs pot portar a una determinació errònia de  $K_H$ .

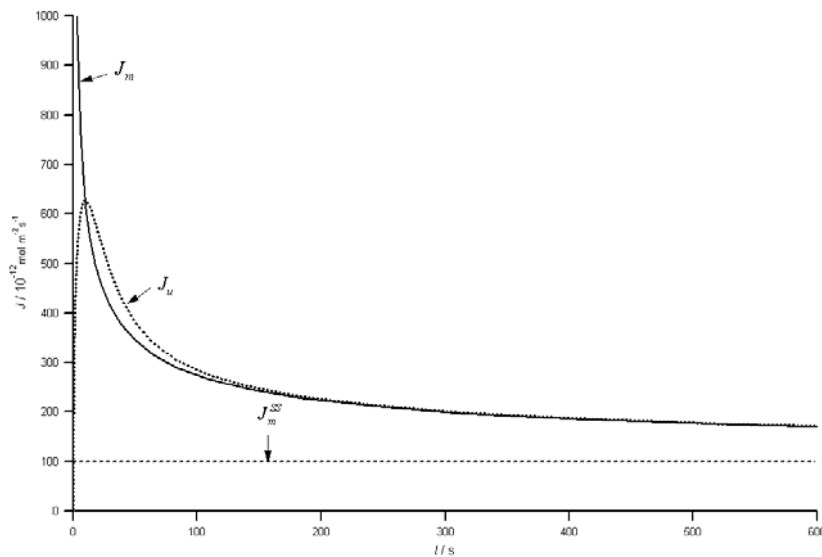


Figura 9.7: Gràfic dels fluxos amb els mateixos paràmetres que en la figura 9.6b, mostrant com la proximitat a l'estat estacionari pot requerir temps molt llargs. La línia de punts correspon a  $J_u$ .

Com és d'esperar, si el sistema està encara lluny de l'estat estacionari, el mètode portarà a valors erronis de  $K_H$ . Amb un altre conjunt de paràmetres (amb un valor més baix de  $D_M$  el qual, per exemple, s'hauria d'aplicar en la difusió macromolecular), la gràfica dels fluxos acumulats (vegeu la figura Fig. 9.6b) mostra clarament que l'ordenada a l'origen no és una mesura de  $I_M$  a l'estat estacionari. Del pendent de la recta que s'ajusta a la part de la dreta de  $\Phi_m$  en la figura 9.6b (la línia de punts i guions que passa pels punts corresponents a  $t=300$  s i  $t=600$  s), s'obté un valor sense significat físic (negatiu) del producte  $K_H k$  i el pendent prediria un valor de  $K_H c_M^{SS}$  al voltant d'unes 35 vegades el valor correcte. La gràfica dels fluxos inicials ( $t < 600$  s) pel sistema (vegeu la figura 9.7) ressalta altre cop que una aparent constància del flux pot amagar una tendència lenta cap a l'estat estacionari i també que després del màxim en la concentració el flux d'assimilació és més gran que el flux d'aport difusiu.

#### 9.4.5 Aplicació a dades experimentals

Slaveykova i Wilkinson (11) obtingueren dades de l'assimilació de  $Pb^{2+}$  per l'alga *Chlorella vulgaris* sota condicions perfectament controlades. En la figura 2 del seu article, representen les quantitats de Pb ingerides per les cèl·lules en les categories d'extractable i no-extractable amb EDTA. Sumant les dues quantitats, obtenim el valor experimental de  $\Phi_m$  en funció del temps, representat amb marcadors en forma de diamants en la figura 9.8. L'aproximació de l'estat estacionari instantani prescriu la regressió lineal d'aquests punts. El valor dels valors resultant del pendent i l'ordenada a l'origen, d'acord amb la interpretació de l'equació (9.24) dona  $J_m^{SS} = 4.79 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  i  $I_M^{SS} = K_H c_M^{SS} = 1.89 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$  respectivament. Usant les equacions (9.14) i

(9.15) amb  $c_M^* = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $D_M = 9.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  i  $r_0 = 1.8 \times 10^{-6} \text{ m}$ , es troba  $K_H = 7.55 \times 10^{-4} \text{ m}$  i  $k = 2.54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ .

A continuació mostrem que aquests paràmetres obtinguts concorden amb l'anàlisi feta per Slaveykova i Wilkinson en base a dos tipus de setis d'adsorció: un amb

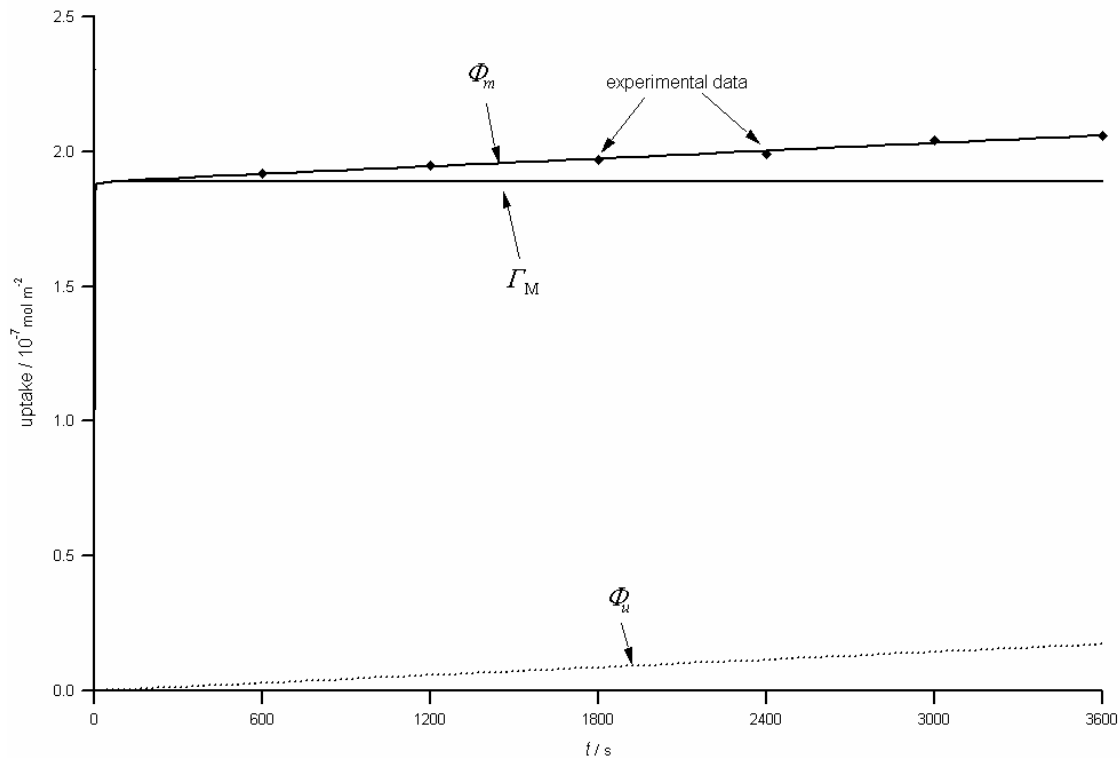


Figura. 9.8: Ajust de les dades experimentals de la figura 2 de la referència (11) (marcadors  $\blacklozenge$ ) amb  $\Phi_m$  obtingut amb l'equació (9.23) usant els paràmetres obtinguts amb la regressió lineal associada a l'equació (9.24):  $K_H = 7.55 \times 10^{-4} \text{ m}$  i  $k = 2.54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  amb  $D_M = 9.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  i  $r_0 = 1.8 \times 10^{-6} \text{ m}$ . També s'inclouen les corbes teòriques per  $\Phi_u$  i  $\Gamma_M$ .

activitat fisiològica (que presenta internalització) i l'altre sense cap tipus d'internalització posterior. Com s'ha descrit en l'apartat 9.2.2, a baixes concentracions de M, el tractament dels dos tipus de setis porta al model lineal amb una  $k$  i  $K_H$  que són promitjos dels paràmetres dels dos tipus de setis. El valor dels paràmetres trobats per aquests autors, en la nostra nomenclatura i unitats, són:  $k_1 = 4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ ;  $K_{M,1} = 3.16 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ ;  $\Gamma_{\max,1} = 1.5 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$ ;  $K_{M,2} = 8.9 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$  i  $\Gamma_{\max,2} = 6.6 \times 10^{-6}$

$\text{mol m}^{-2}$ . Substituint aquests paràmetres en l'equació (9.13) s'obté que el valor esperat de  $k$  és  $2.59 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$  el qual resulta força comparable amb el nostre valor de  $k = 2.54 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ . Anàlogament, aplicant l'equació (9.12), el valor esperat de  $K_H$  a partir dels seus paràmetres és  $7.88 \times 10^{-4} \text{ m}$  que concorda amb el nostre valor de  $K_H = 7.55 \times 10^{-4} \text{ m}$ .

Com s'ha vist en la figura 9.8, els paràmetres calculats amb ISSA també permet que el valor calculat de  $\Phi_m$  (amb l'equació (9.23)) s'ajusti força bé amb les dades experimentals. El màxim en  $I_M$  no es pot veure perquè apareix als 1000 minuts aproximadament i la diferència amb el valor de l'estat estacionari és completament negligible. El temps necessari per assolir un valor 10% superior del valor del flux d'estat estacionari  $J_m^{SS}$  es pot llegir de la figura 9.5: les coordenades del sistema amb els paràmetres obtinguts (2.61,-7.08) s'han marcat amb una creu, i es pot estimar un temps adimensional aproximat de  $10^{4.2}$  (corresponent a  $t \approx 54 \text{ s}$ ).

Per tant el model transitori proposat aquí explica les grans quantitats acumulades mesurades (quan ja s'ha establert l'estat estacionari) com degudes a un creixement ràpid inicial de  $\Phi_m$  associat amb l'adsorció. Val la pena remarcar que, encara que els fluxos transitoris - que s'espera que hagin acabat en 54 segons en aquest cas - no s'han pogut registrar experimentalment, les seves conseqüències en la quantitat acumulada són significatives.

## 9.5 Conclusions

Conèixer expressions analítiques per la concentració a la superfície, fluxos i quantitats acumulades el llarg de l'evolució de l'assimilació permet: i) confirmar la validesa general de l'anàlisi dels fluxos a través del marc interpretatiu de l'estat estacionari (i.e. determinant un valor fixe del productes  $k$   $K_H$ ); ii) adonar-se que per determinades combinacions de paràmetres (baixos valors de  $D_M$  i de  $k$ ;  $r_0$  i  $K_H$  grans) es pot tenir una pèrdua significativa de precisió a partir d'anàlisis deguts a règims transitoris més llargs; iii) analitzar qualsevol descomposició proposada dels productes  $k$   $K_H$  si es coneixen les quantitats acumulades; iv) la determinació individual de  $k$  i  $K_H$  si es disposa de dades transitòries; iv) validar el mètode ISSA (on  $K_H$  es determina a partir de la regressió lineal associada a l'equació (9.24)). La implementació del mètode ISSA amb dades experimentals de la literatura resulta satisfactòria.

## 9.6 Referències

1. Whitfield, M.; Turner, D. R. In *Chemical Modeling in Aqueous Systems*; Jenne, E. A., Ed.; American Chemical Society: Washington DC, 1979; pp 657-680.
2. Morel, F. M. M.; Hering, J. G. In *Principles and Applications of Aquatic Chemistry*; John Wiley: New York, 1993; pp 319-420.
3. Tessier, A.; Buffle, J.; Campbell, P. G. C. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*; Buffle, J., DeVitre, R. R., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1994; pp 197-230.
4. Stumm, W.; Morgan, J. J. In *Aquatic Chemistry*; John Wiley: New York, 1996; pp 614-671.
5. Hudson, R. J. M.; Morel, F. M. M. Iron transport in marine-phytoplankton - kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol.Oceanogr.* **1990**, *35*, 1002-1020.
6. Phinney, J. T.; Bruland, K. W. Trace metal exchange in solution by the fungicides Ziram and Maneb (dithiocarbamates) and subsequent uptake of lipophilic organic zinc, copper and lead complexes into phytoplankton cells. *Environ.Toxicol.Chem.* **1997**, *16*, 2046-2053.
7. Knauer, K.; Behra, R.; Sigg, L. Adsorption and uptake of copper by the green alga *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyta). *J.Phycol.* **1997**, *33*, 596-601.
8. Croot, P. L.; Karlson, B.; Van Elteren, J. T.; Kroon, J. J. Uptake of  $^{64}\text{Cu}$  oxine by marine phytoplankton. *Environ.Sci.Technol.* **1999**, *33*, 3615-3621.

9. Kujawinski, E. B.; Farrington, J. W.; Moffett, J. W. Importance of passive diffusion in the uptake of polychlorinated biphenyls by phagotrophic protozoa. *Appl.Environ.Microbiol.* **2000**, *66*, 1987-1993.
10. Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Thiosulfate enhances silver uptake by a green alga: Role of anion transporters in metal uptake. *Environ.Sci.Technol.* **2001**, *35*, 2214-2218.
11. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ.Sci.Technol.* **2002**, *36*, 969-975.
12. Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, W. R.; Vigneault, B. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the Biotic Ligand Model. *Comp.Biochem.Physiol.C* **2002**, *133*, 189-206.
13. Campbell, P. G. C. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester (UK), 1995; pp 45-102.
14. Pinheiro, J. P.; van Leeuwen, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability. 2. Radial diffusion effects in the microorganism range. *Environ.Sci.Technol.* **2001**, *35*, 894-900.
15. Hudson, R. J. M. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci.Total Envir.* **1998**, *219*, 95-115.
16. Lazier, J. R. N.; Mann, K. H. Turbulence and the diffusive layers around small organisms. *Deep-Sea.Res.* **1989**, *36*, 1721-1733.
17. KarpBoss, L.; Boss, E.; Jumars, P. A. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanogr.Mar.Biol.* **1996**, *34*, 71-107.
18. Holub, K. Surface reaction of an adsorbed substance transported by diffusion to a spherical electrode. *Collect.Czech.Chem.Commun.* **1966**, *31*, 1655-1665.
19. Hudson, R. J. M.; Morel, F. M. M. Trace-metal transport by marine microorganisms - implications of metal coordination kinetics. *Deep-Sea.Res.Part I* **1993**, *40*, 129-150.
20. van Leeuwen, H. P.; Pinheiro, J. P. Speciation dynamics and bioavailability of metals. Exploration of the case of two uptake routes. *Pure Appl.Chem.* **2001**, *73*, 39-44.
21. Pinheiro, J. P.; Galceran, J.; van Leeuwen, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Bulk depletion effects. *Environ.Sci.Technol.* **2004**, *38*, 2397-2405.
22. Wolf-Gladrow, D. A.; Bijma, J.; Zeebe, R. E. Model simulation of the carbonate chemistry in the microenvironment of symbiont bearing foraminifera. *Mar.Chem.* **1999**, *64*, 181-198.
23. Kuma, K.; Tanaka, J.; Matsunaga, K.; Matsunaga, K. Effect of hydroxamate ferrisiderophore complex (ferrichrome) on iron uptake and growth of a coastal marine diatom, *Chaetoceros sociale*. *Limnol.Oceanogr.* **2000**, *45*, 1235-1244.
24. Heyrovský, J.; Kuta, J. *Principles of Polarography*, Academic Press: New York, 1966.
25. DeJong, H. G.; van Leeuwen, H. P. Voltammetry of Metal-Complex Systems with Different Diffusion- Coefficients of the Species Involved .2. Behavior of the Limiting Current and Its Dependence on Association Dissociation Kinetics and Lability. *J.Electroanal.Chem.* **1987**, *234*, 17-29.
26. Bates, S. S.; Tessier, A.; Campbell, P. G. C.; Buffle, J. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas-variabilis* and *Scenedesmus-subspicatus* (*Chlorophyceae*) grown in semi-continuous culture. *J.Phycol.* **1982**, *18*, 521-529.

27. Sanford, L. P.; Crawford, S. M. Mass transfer versus kinetic control of uptake across solid- water boundaries. *Limnol.Oceanogr.* **2000**, *45*, 1180-1186.
28. Oldham, K. B.; Myland, J. C. In *Fundamentals of Electrochemical Science*; Academic Press: San Diego, 1994; pp 263-308.
29. Holub, K.; van Leeuwen, H. P. Influence of reactant adsorption on limiting currents in normal pulse polarography .2. Theory for the stationary, spherical electrode. *J.Electroanal.Chem.* **1984**, *162*, 55-65.
30. Abramowitz, M.; Stegun, I. A. *Handbook of Mathematical Functions*, Dover: New York, 1986.
31. Hassler, C. S.; Wilkinson, K. J. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ.Toxicol.Chem.* **2003**, *22*, 620-626.
32. Holub, K.; Koryta, J. Surface reaction of adsorbed substance transported by diffusion to a plane electrode. *Collect.Czech.Chem.Communic.* **1965**, *30*, 3785-3796.
33. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Control of Cd concentrations in a coastal diatom by interactions among free ionic Cd, Zn, and Mn in seawater. *Environ.Sci.Technol.* **1998**, *32*, 2961-2968.
34. Mirimanoff, N.; Wilkinson, K. J. Regulation of Zn accumulation by a freshwater gram-positive bacterium (*Rhodococcus opacus*). *Environ.Sci.Technol.* **2000**, *34*, 616-622.
35. Zoski, C. G.; Bond, A. M.; Allinson, E. T.; Oldham, K. B. How long does it take a microelectrode to reach a voltammetric steady-state? *Anal.Chem.* **1990**, *62*, 37-45.
36. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 1980.
37. Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ.Toxicol.Chem.* **2000**, *19*, 2769-2778.
38. Vasconcelos, M. T. S. D.; Leal, M. F. C. Adsorption and uptake of Cu by *Emiliania huxleyi* in natural seawater. *Environ.Sci.Technol.* **2001**, *35*, 508-515.



# Capítol 10

Flux transitori de  
bioassimilació i acumulació.

Adsorció langmuiriana

Part d'aquest capítol ha estat publicat a

**Marine Chemistry** 99 (2006) 162-176

## **10. Flux transitori de bioassimilació i acumulació. El cas de dos tipus de setis amb adsorció Langmuiriana**

### **10.1 Introducció**

La comprensió detallada de l'assimilació d'una espècie (ja sigui un nutrient o un tòxic) per part dels organismes (per exemple, el fitoplàncton) és essencial per un gran nombre de propòsits, que van des de la regulació ambiental fins als aspectes bàsics de la ciència biomedioambiental (1,2). Una qüestió clau és constatar que per enfrontar-se a la interpretació de les dades amb el rigor apropiat cal que els experiments es duguin a terme en medis perfectament ben controlats (3,4). En aquest sentit, els models poden ajudar a identificar els fenòmens més rellevants i fixar mètodes apropiats per obtenir els paràmetres característics del sistema.

Alguns models ben coneguts, com el Model de l'Activitat del Ió Lliure (FIAM: Free Ion Activity Model) o el Model del Lligand Biòtic (BLM: Biotic Ligand Model), ja comentats en el capítol 3, descarten la influència de la difusió en el flux d'assimilació (això és, en la quantitat de les espècies rellevants que arriben a la superfície de l'organisme per unitat d'àrea i de temps) i es poden classificar com aproximacions "d'equilibri" (5-8). Tanmateix, aquesta simplificació no és vàlida en totes les situacions, com s'ha demostrat en diferents articles recents (9-12). Tenint en compte la difusió, hem analitzat, en el capítol anterior, el cas particular en el que l'assimilació s'ha descrit en termes d'adsorció lineal en els setis a la superfície de l'organisme, seguida per un procés cinètic d'internalització de primer ordre (13).

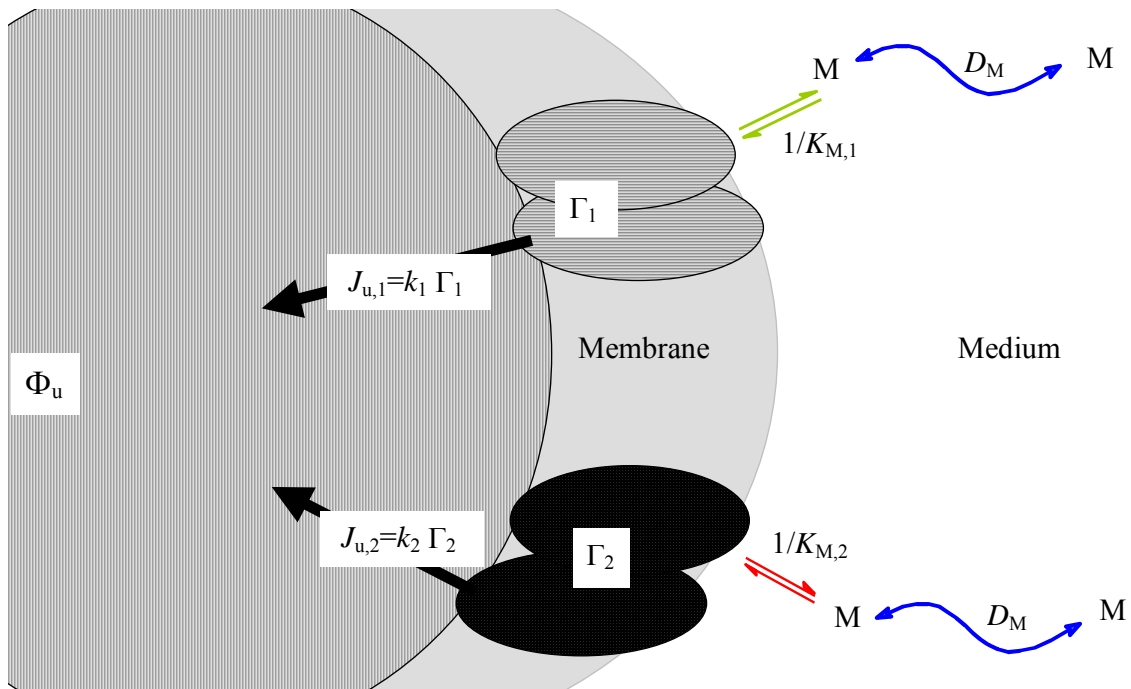


Figura 10.1: Esquema del model d'assimilació mostrant la difusió esfèrica de l'espècie M a través del medi cap a dos tipus d'internalització diferents, en els que té lloc adsorció langmuiriana i a la que pot seguir internalització. El radi del microorganisme és  $r_0$ .  $\Phi_u$  és la quantitat internalitzada (dins de la cèl·lula).

A més de la difusió, un altre aspecte a considerar és el nombre de tipus de setis i la seva naturalesa (en termes tant de la seva activitat fisiològica com de la isoterma d'adsorció específica). Per tal d'interpretar l'assimilació de Zn per l'organisme *Emiliana huxleyi*, Sunda i Huntsman (3) van introduir la distinció entre dos tipus de setis d'adsorció – internalització, en els que l'adsorció era descrita amb una isoterma de Langmuir en un d'ells, i per una isoterma lineal en l'altre. (Una isoterma Langmuiriana seguida d'una internalització de primer ordre és equivalent a una descripció del tipus Michaelis-Menten (2) en l'estat estacionari pels setis transportadors en la membrana). En la interpretació de l'assimilació de Pb per *Chlorella kesslerii*, feta per Slaveykova i Wilkinson (4) també utilitzen dos tipus de setis Langmuirians, un fisiològicament actiu (i.e. la internalització segueix a l'adsorció) i l'altre no (i.e. només adsorció). El nostre model lineal anterior (2,13) podia abastar qualsevol nombre de setis fisiològicament actius i no actius (mitjançant paràmetres promitjats) sempre i quan els recobriments

fossin prou petits per poder utilitzar isoterms lineals en cada tipus de seti (vegeu l'apartat 6.2.2.3 i 9.2.2). Tanmateix, una isoterma d'adsorció lineal no pot contemplar els efectes de saturació com els observats en els experiments de Slaveykova i Wilkinson (4) que cal esperar que apareguin a causa del nombre finit de transportadors. Aquí millorem el nostre model lineal previ amb l'ús de la isoterma de Langmuir amb dues classes de setis d'adsorció (l'extensió a un nombre més gran de setis és directa). Un model com aquest pot identificar paràmetres que corresponen a situacions límit donades pels simplistes FIAM, BLM i del model lineal.

Un tercer aspecte és la consideració de la geometria i la mida del micro organisme. Aquí considerem la geometria esfèrica, més senzilla; el model es pot adaptar fàcilment per incloure setis ubicats en una superfície activa semiesfèrica. Com a conseqüència del petit radi dels micro-organismes aquàtics, s'arriba ràpidament a l'estat estacionari; en conseqüència la majoria de tècniques experimentals disponibles no són capaces de seguir el règim transitori inicial de l'experiment ni de distingir fluctuacions de la concentració del solut (regions "desiguals") (14).

Usarem el nostre model per avaluar la validesa de l'aproximació habitual de l'estat estacionari (i.e. sense considerar l'evolució del transitori). No només ens interessa la qüestió del valor del flux, sinó també quin és l'impacte del règim transitori en la quantitat acumulada, la importància de la qual ja hem comentat en el capítol anterior (13). El seu coneixement permet una valoració crítica de les limitacions de certs procediments suggerits recentment (basats en l'Aproximació de l'Estat Estacionari Instantani, ISSA) per obtenir paràmetres del sistema a partir del pendent i de l'ordenada a l'origen de les gràfiques de les quantitats acumulades versus el temps (4,12,13,15-17).

## 10.2 Formulació matemàtica del model.

En l'apartat 2 del capítol 6 i en els subapartats corresponents, s'ha plantejat el desenvolupament matemàtic corresponent al model actual, amb els diferents casos particulars considerats, i s'ha assentat la base de càlcul que s'ha incorporat a un programa numèric de resolució, en llenguatge Fortran, que s'ha utilitzat per a l'anàlisi de les qüestions plantejades en aquest capítol.

Resumidament, el marc bàsic del present model és el següent. Sigui M una espècie química (present al si del medi a una concentració  $c_M^*$ ) que es difon cap a la superfície, suposada esfèrica, del micro-organisme i de radi  $r_0$  (vegeu la Fig 10.1). Suposant que la difusió és l'únic mecanisme rellevant de transport, l'equació de continuïtat s'escriu

$$\frac{\partial c_M(r,t)}{\partial t} = D_M \left( \frac{\partial^2 c_M(r,t)}{\partial r^2} + \frac{2}{r} \frac{\partial c_M(r,t)}{\partial r} \right) \quad (10.1)$$

En el cas més general considerat aquí, M és adsorbit en dos tipus de setis, anomenats 1 i 2. Cada procés d'adsorció se suposa que és prou ràpid (comparat amb la difusió o amb la internalització) per poder ser descrit amb una isoterma d'equilibri de Langmuir que relaciona el recobriment de cada tipus de seti ( $\Gamma_1(t)/\Gamma_{\max,1}$  i  $\Gamma_2(t)/\Gamma_{\max,2}$ ) amb la concentració de M a la superfície de l'organisme  $c_M(r_0,t)$ :

$$\frac{\Gamma_1(t)}{\Gamma_{\max,1}} = \frac{c_M(r_0,t)}{K_{M,1} + c_M(r_0,t)} \quad (10.2)$$

$$\frac{\Gamma_2(t)}{\Gamma_{\max,2}} = \frac{c_M(r_0,t)}{K_{M,2} + c_M(r_0,t)} \quad (10.3)$$

on  $\Gamma_1$  i  $\Gamma_2$  són les concentracions superficials i  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$  són constants d'adsorció en la formulació de Michaelis-Menten de la isoterma de Langmuir (2,18).

Suposem que M és ingerit seguint un procés cinètic de primer ordre (2,18-20) en cada un dels setis (en els que M ha estat adsorbit) amb constants cinètiques de velocitat  $k_1$  i  $k_2$ , donant lloc a un flux d'assimilació:

$$J_u(t) = J_{u,1}(t) + J_{u,2}(t) = k_1\Gamma_1(t) + k_2\Gamma_2(t) \quad (10.4)$$

Com ja hem comentat, per valors de  $c_M(r_0, t)$  molt menors que  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$ , les isoterms langmuirianes (10.2) i (10.3) tendeix a les lineals. Per altra banda, quan  $c_M(r_0, t)$  és bastant més gran que  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$ , la saturació dels setis actius (transportadors de membrana) porta a un màxim pel flux d'assimilació  $J_u$ , que result inexistent en el cas de la isoterma lineal.

Com és d'esperar de la presència de termes no lineals (isoterms de Langmuir) en les condicions de contorn, no es disposa de solucions analítiques (que tinguem coneixement) pel problema plantejat (eqn. (10.1) amb les condicions de contorn (6.43), (6.2) i (6.3)), i per tant apliquem una estratègia numèrica de resolució, que s'ha descrit en l'apartat 2.2.2 del capítol 6. Un cop s'ha resolt la integral (6.51), es pot calcular qualsevol magnitud del sistema. En particular, s'ha escollit en aquest estudi el flux difusiu entrant (o de transport màssic)

$$J_m(t) \equiv D_M \left( \frac{\partial c_M(r, t)}{\partial r} \right)_{r=r_0} \quad (10.5)$$

com a funció resposta rellevant. Cal observar que s'ha assignat signe positiu als fluxos que van cap al microorganisme.

La quantitat subministrada acumulada (via transferència màssica, anomenada aquí  $\Phi_m$ ) en qualsevol moment, es pot calcular com la quantitat internalitzada,  $\Phi_u$ , més la quantitat adsorbida. Així, suposant que  $\Gamma_1(0)=\Gamma_2(0)=0$ , tenim:

$$\Phi_m(t) = \int_0^t J_m(\tau) d\tau = \Phi_u(t) + \Gamma(t) = \int_0^t J_u(\tau) d\tau + \Gamma_1(t) + \Gamma_2(t) \quad (10.6)$$

### 10.3 El règim d'estat estacionari

Considerem el cas senzill de l'estat estacionari, que s'assoleix a la pràctica en un temps molt curt per un radi  $r_0$  suficientment petit. En aquest cas, el balanç de fluxos  $J_m=J_u$  es pot escriure (18):

$$D_M \frac{c_M^* - c_M(r_0)}{r_0} = k_1 \Gamma_{\max,1} \frac{c_M(r_0)}{K_{M,1} + c_M(r_0)} + k_2 \Gamma_{\max,2} \frac{c_M(r_0)}{K_{M,2} + c_M(r_0)} \quad (10.7)$$

El impacte dels paràmetres en la solució d'aquesta equació cúbica per la incògnita  $c_M(r_0)$  s'ha analitzat mitjançant un procediment gràfic (2). El punt clau en aquest procediment és determinar la intersecció de la línia recta del membre de l'esquerra de l'equació (10.7) (anomenada  $J_m^{\text{dss}}$ , el flux difusiu d'estat estacionari, corresponent al perfil de difusió havent assolit l'estat estacionari per a qualsevol valor donat de concentració a la superfície) i  $J_u$ , quan es dibuixen els fluxos d'assimilació davant d'una concentració variable a la superfície,  $c_M(r_0)$ .



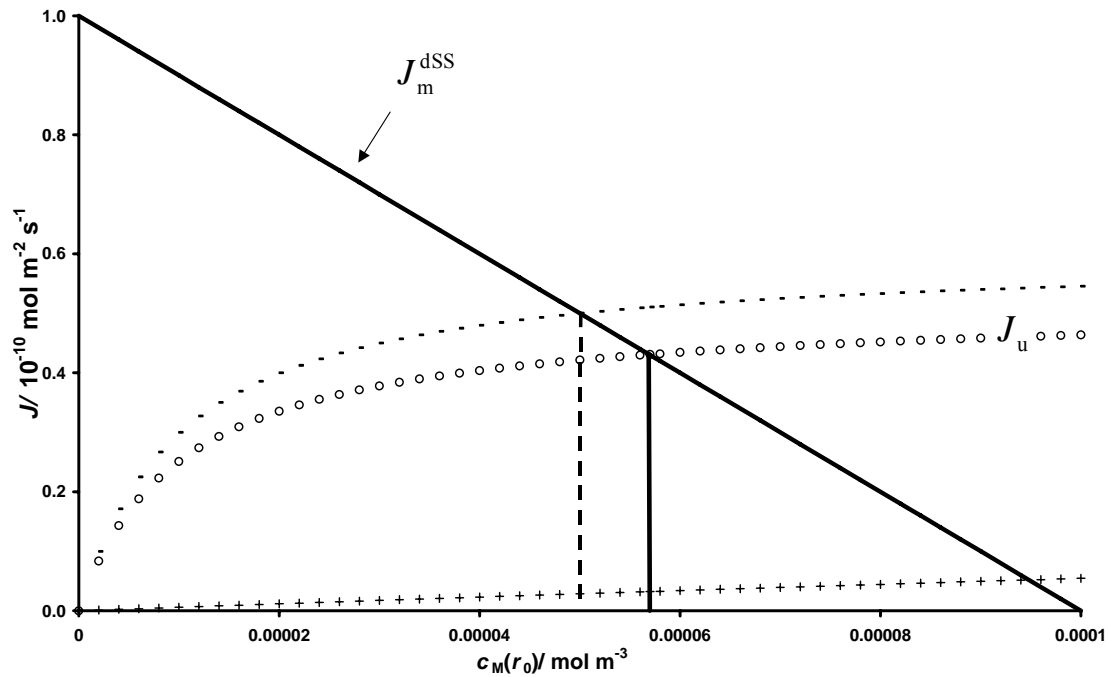


Fig 10.2 : Gràfics dels fluxos vs.  $c_M(r_0)$  en els que es mostra l'aplicació del procediment gràfic en 3 cassos diferents amb adsorció langmuiriana. La línia recta amb pendent negatiu correspon al flux difusiu d'estat estacionari  $J_m^{dSS}$ . Els marcadors corresponen al flux d'assimilació  $J_u$  pels tres sistemes considerats: o (cercles buits):  $K_{M,1}=10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$  i  $K_{M,2}=10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ; - (menys) :  $K_{M,1}=K_{M,2}=10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ; + (més)  $K_{M,1}=K_{M,2}=10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ . L'ordenada de la intersecció de la línia continua dona el valor de  $J_m^{SS}$ , mentre que l'abscissa és  $c_M^{SS}$ . Altres paràmetres:  $D_M=10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_m^*=10^{-4} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ,  $r_0=1 \text{ mm}$ ,  $k_1=10^{-2} \text{ s}^{-1}$ ,  $k_2=10 \text{ s}^{-1}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=10^{-8} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}$  i  $\Gamma_{\max,2}=10^{-12} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-2}$ .

Com s'ha indicat a l'apartat 2.2.1 del capítol 6, les tres solucions de  $c_M(r_0)$  es poden trobar gràficament (2) a cada intersecció de  $J_m^{dSS}$  amb la corba  $J_u=J_{u,1}+J_{u,2}$  (que és la suma de dues hipèrboles amb les seves corresponents asymptotes verticals a  $c_M(r_0)=-K_{M,1}$  i a  $c_M(r_0)=-K_{M,2}$ ). A causa del caràcter positiu de totes les constants físiques, i tal com s'ha demostrat en 6.2.2.1, dues de les solucions de (10.7) són negatives, mentre la tercera (que denotarem  $c_M^{SS}$ ) és positiva i és la única que té significat físic. La figura 10.2 representa el domini positiu de  $c_M(r_0)$  i mostra com el procediment gràfic porta a la determinació de tres valors de  $c_M^{SS}$  per tres cassos diferents on tots els paràmetres, excepte  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$ , s'han mantingut constants. Si ens fixem en

el cas  $K_{M,1} \neq K_{M,2}$  (cerques buits en la figura 10.2), veiem en les abscisses un valor al voltant de  $5.7 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3}$  (vegeu la línia contínua vertical) i un valor de  $J_m^{\text{SS}}$  aproximadament  $4.3 \times 10^{-11} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . També s'inclou, a efecte de comparar, les isoterms linealitzades (usant les equacions (6.64) i (6.65) amb  $k_2 = 0$  (13) amb els paràmetres corresponents al cas  $K_{M,1} \neq K_{M,2}$ ) i s'aprecia clarament com l'efecte de la saturació redueix la concentració potencial a la superfície i, per tant, el valor dels fluxos d'estat estacionari.

Per tal de processar les dades amb una expressió més simple (i treballar amb menys paràmetres incògnita) és convenient introduir alguna aproximació a l'equació cúbica (10.7). Una possible opció és substituir els valors de  $K_{M,1}$  i  $K_{M,2}$  en els denominadors de l'equació (10.7) per un valor comú. Es pot prendre, per exemple

$$K_M = \min(K_{M,1}, K_{M,2}) \quad (10.8)$$

La figura 10.2 il·lustra que aquesta aproximació porta a un valor de la solució  $c_M^{\text{SS}}$  infravalorada (vegeu la intersecció de la línia contínua amb els marcadors -, indicat amb una línia vertical de guions, a l'esquerra de la solució exacta) i per tant se sobrevalora el flux estacionari  $J_m^{\text{SS}}$ . L'altra opció de prendre  $K_M = \max(K_{M,1}, K_{M,2})$  porta a una sobrevaloració de  $c_M^{\text{SS}}$ .

L'avantatge de combinar (e.g. promitjant) els valors de  $K_M$  resideix en la simplificació de l'equació cúbica (10.7) a una equació quadràtica la solució de la qual pot escriure's com una mena d'equació de Best modificada (21):

$$\frac{c_M^{SS}}{c_M^*} \approx \frac{(1-a-b) + \sqrt{(1-a-b)^2 + 4a}}{2} \quad (10.9)$$

amb un paràmetre de bio afinitat  $a$

$$a \equiv \frac{K_M}{c_M^*} \quad (10.10)$$

i  $b$ , la relació límit de flux

$$b \equiv \frac{k_1 \Gamma_{\max,1} + k_2 \Gamma_{\max,2}}{D_M c_M^* / r_0} \quad (10.11)$$

La relació no lineal (especialment clara per valors grans de  $k_1$  i  $k_2$ ) entre  $c_M^{SS}$  i  $c_M^*$  donada per l'equació (10.9) combinada amb la relació de Michaelis-Menten entre  $J_m^{SS}$  i  $c_M^{SS}$  (associada a les isoterms d'adsorció de Langmuir (10.2) i (10.3)) comporta una relació complexa entre  $J_m^{SS}$  i  $c_M^*$ . Un valor del pendent de  $J_m^{SS}$  versus  $c_M^*$  entre 0 (associat a una cinètica d'ordre zero quan els transportadors estan saturats) i 1 (per la cinètica de primer ordre i adsorció lineal quan hi ha una baixa concentració de metall lliure) sembla raonable en el context d'adsorció langmuiriana. Així, si un conjunt de dades experimentals mostra un pendent diferent de 1, no significa necessàriament, *per se*, cap trencament del present model (difusió + equilibri d'adsorció + cinètica d'internalització de primer ordre). Podem concloure, també, que si la gràfica experimental  $J_m^{SS}$  vs  $c_M^*$  no és lineal (vegeu, per exemple, la curvatura de les dades en la referència (4)), el model d'isoterma lineal ja no pot ser suficient per explicar aquestes dades i es fa necessari recórrer a una aproximació langmuiriana com s'ha fet, per exemple, en la referència (4) i en aquest treball.

### 10.4 L'evolució dels fluxos i les quantitats acumulades en aproximar-se al règim estacionari

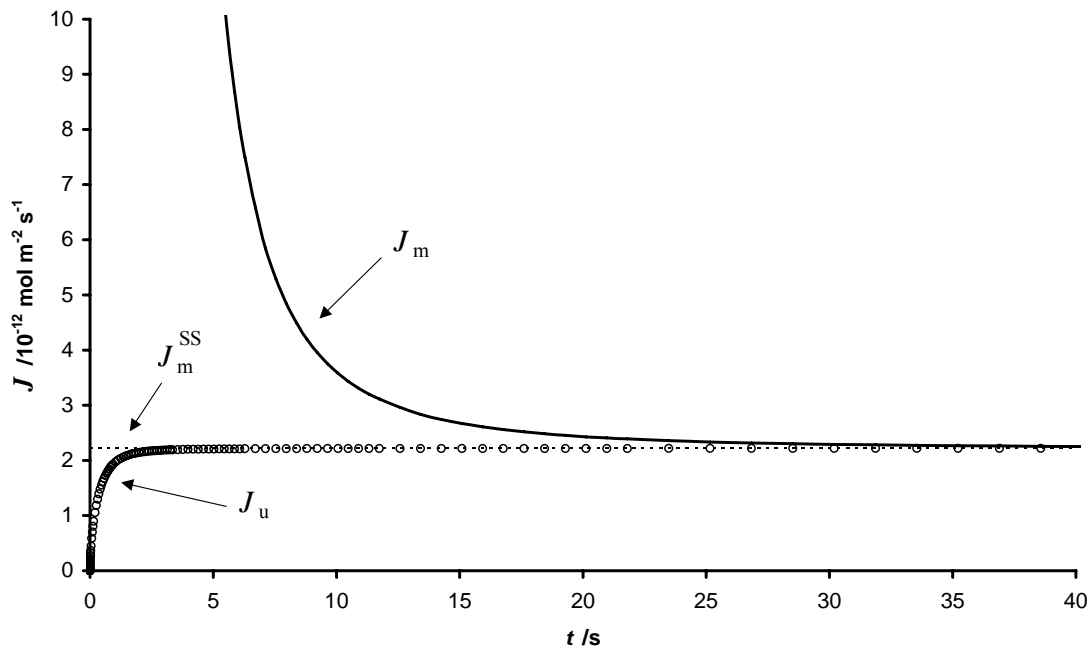


Figura 10.3: Evolució dels fluxos en els estadis primerencs del procés d'assimilació. Tant  $J_m$  (línea contínua) com  $J_u$  (marcador o) tendeixen a  $J_m^{SS}$  (línea discontinua). Paràmetres:  $D_M=10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^*=10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $r_0=10 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $K_{M,1}=3.98 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $K_{M,2}=6.3 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=1.5 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $\Gamma_{\max,2}=4 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $k_1=2 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$  i  $k_2=4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

La figura 10.3 mostra l'evolució dels fluxos entrants  $J_m$  i  $J_u$  amb el temps per un conjunt típic de paràmetres extrets de la literatura (1). Com és d'esperar, el flux difusiu  $J_m$  decreix amb el temps i tendeix al valor estacionari en el que convergeix amb  $J_u$ . Es pot observar que el règim transitori és molt curt, tal que als 40 s aproximadament, tot el  $J_m$  subministrat és internalitzat com  $J_u$ . En qualsevol cas, el règim transitori pot explicar el sobtat increment de la quantitat adsorbida ( $\Gamma=\Gamma_1+\Gamma_2$ ) i de la quantitat total acumulada ( $\Phi_m$ ), com es veu, pel mateix sistema, en la figura 10.4. Els resultat per  $\Phi_m$  i  $\Phi_u$  en la isoterma lineal corresponent (on els paràmetres lineals s'han calculat amb les equacions (6.64) i (6.65), equació (29) en la referència (2)) indica que la saturació ha limitat les quantitats acumulades en el cas langmuirià, però la forma general de les corbes

d'assimilació és essencialment el mateix en els dos tipus d'adsorció.

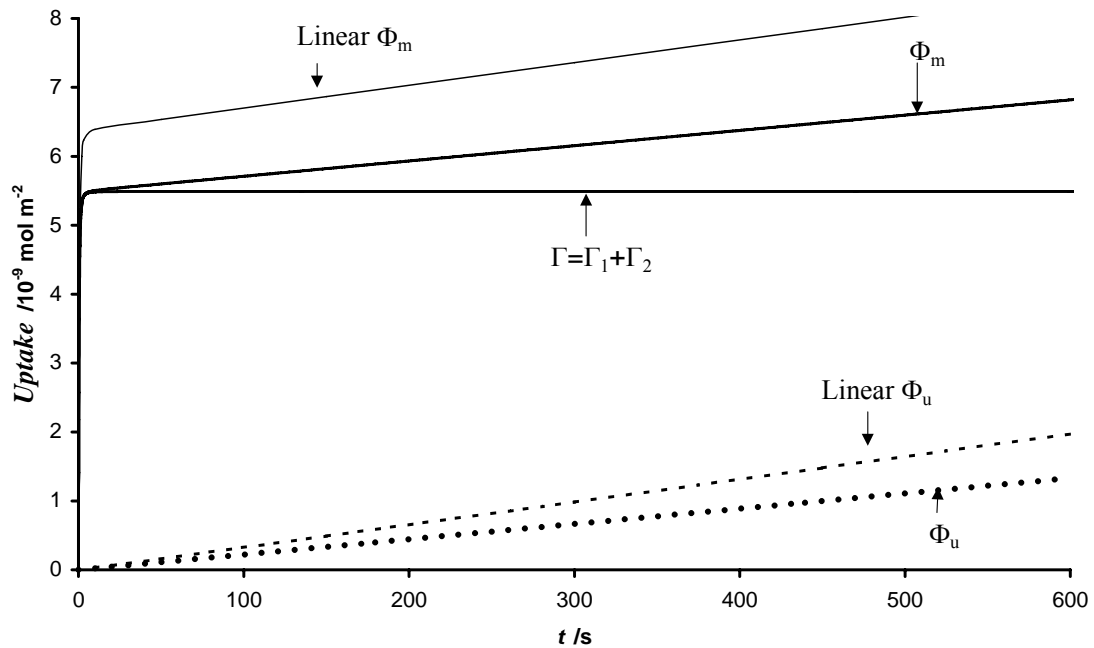


Fig 10.4 : Evolució de les quantitats acumulades en els primers estadis del procés d'assimilació, mostrant l'augment sobtat de les quantitats adsorbida i total.  $\Phi_m$  indica la càrrega total subministrada (internalitzada i adsorbida); la quantitat internalitzada (cel·lular)  $\Phi_u$  es mostra en la línia de punts; la quantitat adsorbida és  $\Gamma = \Gamma_1 + \Gamma_2$ . Mateixos paràmetres que en la figura anterior.

Amb valors típics extrets de la literatura (agafant el valor més gran de  $k_1$  indicat en (1)), podem veure clarament en la figura 10.5 un màxim de  $J_u$  durant el règim transitori ( $t \approx 6$  s). De fet, com s'ha indicat en el capítol anterior, l'existència d'un màxim es pot demostrar pel cas d'assimilació lineal (13) i sempre s'ha trobat en les simulacions numèriques amb adsorció langmuiriana. De totes maneres, aquest màxim en  $J_u$  (que és conseqüència d'un màxim en  $c_M(r_0, t)$ ) es troba normalment tan prop del valor de l'estat estacionari que presenta poca rellevància a efectes pràctics.

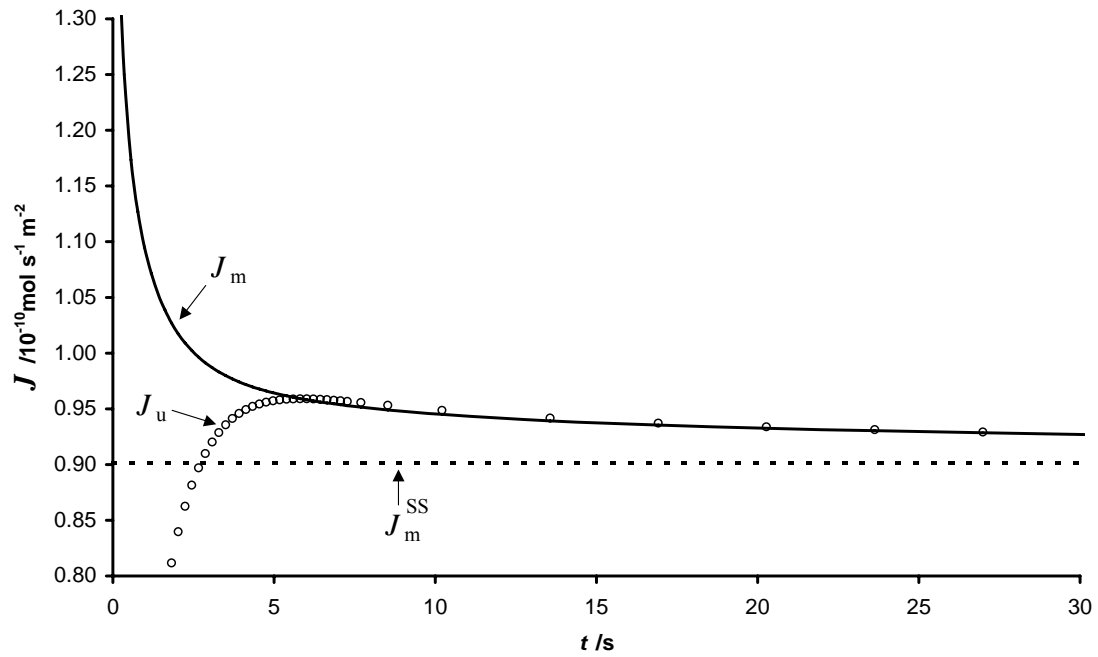


Figura 10.5: Evolució del flux mostrant un màxim en  $J_u$  (marcador o). El flux difusiu  $J_m$  (línia contínua) decreix en augmentar el temps. La línia horitzontal discontinua correspon al valor del flux difusiu final d'estat estacionari  $J_m^{SS}$ . Paràmetres:  $D_M=10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^*=10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $r_0=10 \text{ } \mu\text{m}$ ,  $K_{M,1}=10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $K_{M,2}=10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ ,  $\Gamma_{\max,2}=4 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2}$ ,  $k_1=1 \text{ s}^{-1}$  i  $k_2=10^{-4} \text{ s}^{-1}$ .

L'excés de  $c_M(r_0)$  respecte de  $c_M^{SS}$  (i.e. el màxim en el transitori de la concentració que està lligat a una evolució essencialment idèntica en  $J_u$ ) es pot entendre si la difusió és el fenomen predominant a temps curts, mentre que la cinètica d'internalització controla el flux a temps llargs (2,13). Es pot observar que en la regió de l'excés ( $t > 6 \text{ s}$ , en la figura 10.5), es veu clarament que  $J_m < J_u$ , mentre la quantitat d'espècie adsorbida en la superfície està decreixent. En general, per qualsevol temps finit, la diferència  $J_m - J_u$  indica l'acumulació (o el decreixement després del màxim) de M en la superfície del micro-organisme com adsorbent.

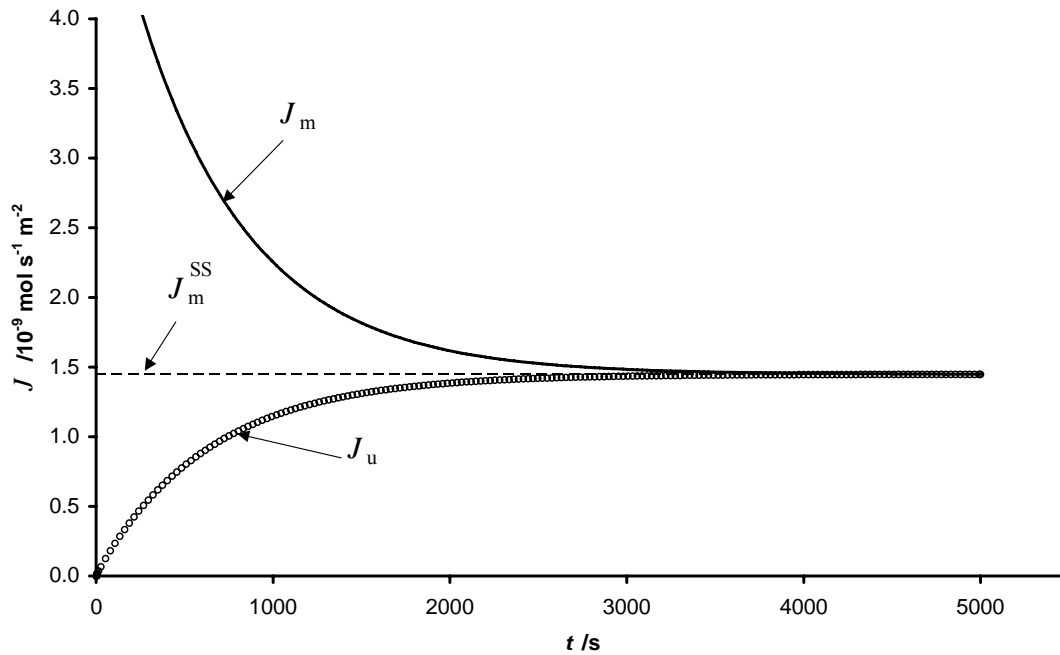


Figura 10.6: Evolució lenta de  $J_m$  i  $J_u$  cap el su valor d'estat estacionari  $J_m^{SS}$ . Paràmetres:  $D_M=9.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^*=10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $r_0=18 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $K_{M,1}=3.16 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $K_{M,2}=8.9 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=1.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $\Gamma_{\max,2}=6.6 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $k_1=4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  i  $k_2=0$ .

Com s'ha discutit en el capítol anterior i en (2,13), l'aproximació cap a l'estat estacionari pot resultar considerablement lenta per algun conjunt de paràmetres, portant a un error considerable en la determinació dels paràmetres característics si els valors del transitori es prenen com a valors finals d'estat estacionari. Per exemple, la figura 10.6 mostra que el valor calculat per  $J_m$  a  $t=1000 \text{ s}$  és encara més d'un 50% més gran que el valor final  $J_m^{SS}$ , en aquest cas particular de un nombre molt gran de receptors actius. Tanmateix, l'error de prendre  $J_m$  com  $J_m^{SS}$  és improbable a la pràctica, si es realitzessin mesures posteriors, ja que els valors experimentals de  $J_m$  no es mantindrien constants durant un període massa llarg.

### 10.5 Quant triga en arribar l'estat estacionari?

Sigui  $t_{SS}$  una estimació del temps que tarda  $c_M(r_0)$  en valer el 95% del valor de l'estat estacionari (l'extensió a qualsevol altra proximitat es pot fer fàcilment). Una manera d'estimar el valor de  $t_{SS}$  és linealitzar les isoterms d'assimilació (vegeu l'apartat 2.2 en el capítol 6 (13)) i substituir  $J_m$  per  $J_m^{dSS}$ . Així, el balanç de fluxos (6.43) es converteix en l'equació diferencial ordinària

$$\left( \frac{\Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}} \right) \frac{dc_M(r_0,t)}{dt} = D_M \frac{c_M^* - c_M(r_0,t)}{r_0} - \left( \frac{k_1 \Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{k_2 \Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}} \right) c_M(r_0,t) \quad (10.12)$$

on la incògnita és  $c_M(r_0,t)$ . La integració des d'un temps inicial  $t=0$  amb  $c_M(r_0,t)=0$  fins a  $t_{SS}$  quan  $c_M(r_0,t)=0.95c_M^{SS}$ , i una mica d'àlgebra elemental, usant el valor aproximat per  $c_M^{SS}$  donat per (10.9) i (10.8), porta a:

$$t_{SS} = \frac{-\left( \frac{\Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{\Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}} \right)}{\frac{D_M}{r_0} + \frac{k_1 \Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{k_2 \Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}}} \ln \left( 1 - \left[ 1 + \frac{r_0}{D_M} \left( \frac{k_1 \Gamma_{\max,1}}{K_{M,1}} + \frac{k_2 \Gamma_{\max,2}}{K_{M,2}} \right) \right] 0.95 \frac{(1-a-b) + \sqrt{(1-a-b)^2 + 4a}}{2} \right) \quad (10.13)$$

L'aplicació de l'equació (10.13) a les dades de la figura 10.3 dóna  $t_{SS}=1.9$  s, mentre que amb la simulació numèrica  $c_M$  assoleix el 95% de  $c_M^{SS}$  a  $t=1.8$  s, el que indica una bona concordança. A aquests temps, el flux difusiu  $J_m$  està encara molt lluny del seu valor estacionari  $J_m^{SS}$ . Usant una mica d'àlgebra (suposant  $c_M^0 = 0.95c_M^{SS}$ ) podem posar que:

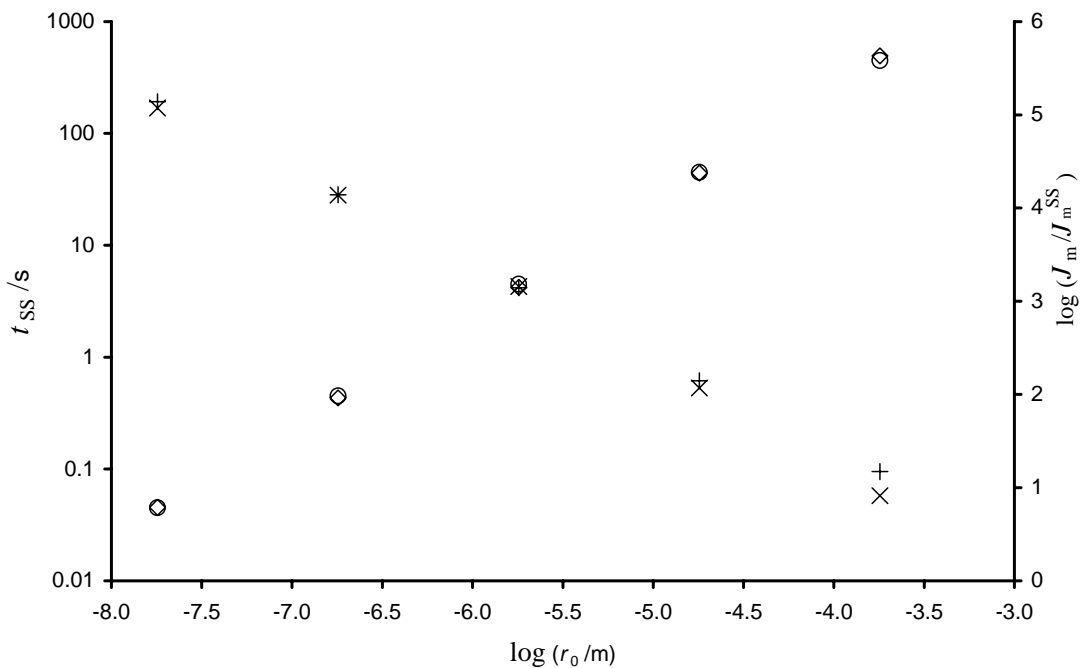
$$\frac{J_m}{J_m^{SS}} = 0.95 + 0.05 \frac{D_M c_M^*}{r_0 J_m^{SS}} \quad (10.14)$$

En el cas particular de la figura 10.3 la fórmula predictiva (10.14) dóna una relació de 226 mentre la obtinguda numèricament és 117. Aquesta discordança relativa (l'ordre de



magnitud és correcte, tanmateix) pot ser deguda a que  $c_M^*$  en la figura 10.3 pot ser una mica alta per la linearització de les isoterms feta en (10.12).

Per la figura 10.6 el  $t_{SS}$  obtingut numèricament és 44.26 s i l'equació (10.13) dóna 45.01 s. La fórmula (10.14) dóna una relació  $J_m/J_m^{SS} = 117$ , mentre que la trobada numèricament és 140.



**Figura 10.7:** Temps necessari perquè  $c_M(r_0,t)$  assoleixi el 95% del seu valor d'estat estacionari  $c_M^{SS}$  ( $t_{SS}$ , representat en l'eix d'ordenades de l'esquerra) en front del radi ( $r_0$ ). Els marcadors diamant corresponen a la solució numèrica amb el nostre programa, mentre els cercles corresponen als càlculs amb l'expressió aproximada. En l'eix vertical de la dreta hem representat la relació  $J_m/J_m^{SS}$  en l'instant  $t_{SS}$  (donat per la solució numèrica) obtingut amb els càlculs numèrics (marcador +) o aplicant l'expressió (10.14) (marcador ×). Paràmetres:  $D_M=9.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^*=2.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $K_{M,1}=3.16 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $K_{M,2}=8.9 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=1.5 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $\Gamma_{\max,2}=6.6 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $k_1=4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  i  $k_2=0$ .

La figura 10.7 mostra que l'estimació donada per l'equació (10.13) és força raonable pel conjunt de paràmetres triat. Altres conjunts de paràmetres (usualment en el rang indicat en (I)) també confirmen la bondat (no es mostra aquí) de l'expressió suggerida. La conclusió clau, però, es treu de l'observació que pels paràmetres indicats en la literatura

(1), amb  $r_0$  no més gran de  $10\mu\text{m}$ ,  $t_{\text{SS}}$  és de l'ordre de segons. Això significa que les mesures experimentals usuals (a temps superiors a 1 minut) correspondran a condicions d'estat estacionari i, així, el flux pot calcular-se amb la part dreta de l'expressió (10.7) reemplaçant  $c_M(r,t)$  amb  $c_M^{\text{SS}}$ . Aquest fet recolza l'ús de les expressions de l'estat estacionari pels fluxos, fins i tot si cal un temps molt més llarg perquè  $J_m$  s'aproximi a  $J_m^{\text{SS}}$  (i.e. un temps més gran que el que necessita  $J_u$  tal com indica l'expressió (10.14); també es pot observar la gràfica amb l'eix Y a la dreta de la figura 10.7). Tanmateix, com es pot veure més endavant, i s'ha vist en el capítol anterior, (i també en la referència (13)) el règim transitori té un impacte en les quantitats acumulades quan el sistema ha assolit l'estat estacionari.

## 10.6 Recuperant paràmetres de les dades de l'acumulació

### 10.6.1 Metodologia ISSA amb la càrrega total

La formulació simple de l'Aproximació de l'Estat Estacionari Instantani (ISSA) (vegeu l'apartat 9.4.4. del capítol anterior i la referència (13)) considera que l'adsorció és pràcticament instantània i que el règim estacionari és assolit des dels instants inicials de l'experiment. La quantitat total (o càrrega total  $\Phi_m$ ) fora del règim transitori pot estimar-se com la suma de la quantitat adsorbida (considerada fixa des de l'inici de l'experiment) i la quantitat internalitzada (que es va acumulant en un règim estacionari des de l'inici):

$$\Phi_m(t) \approx \Gamma^{\text{SS}} + J_m^{\text{SS}} \cdot t \quad (10.15)$$

En adsorció lineal s'ha demostrat que aquest procediment és vàlid per un conjunt de paràmetres típics (apartat 9.4.5 del capítol anterior i referència (4)) i pot portar a obtenir

amb èxit els valors dels paràmetres desconeguts (constant de velocitat d'internalització de primer ordre  $k$  i constant d'adsorció lineal,  $K_H$ ). A més, s'ha demostrat (capítol anterior i (2)) que aquest procediment és vàlid per qualsevol conjunt d'isotermes, a baix recobriment, obtenint un promig ponderat dels paràmetres característics de les isotermes considerades. Aquí, ara valorem la utilitat de la mateixa aproximació pel cas més general en el que un tipus de seti internalitza (després d'adsorció langmuiriana) i un altre tipus de seti no internalitza (només adsorbeix amb isoterma de Langmuir) (4). Aquest model de només una ruta d'internalització és tinguda en compte en el nostre desenvolupament numèric fent senzillament  $k_2=0$ .

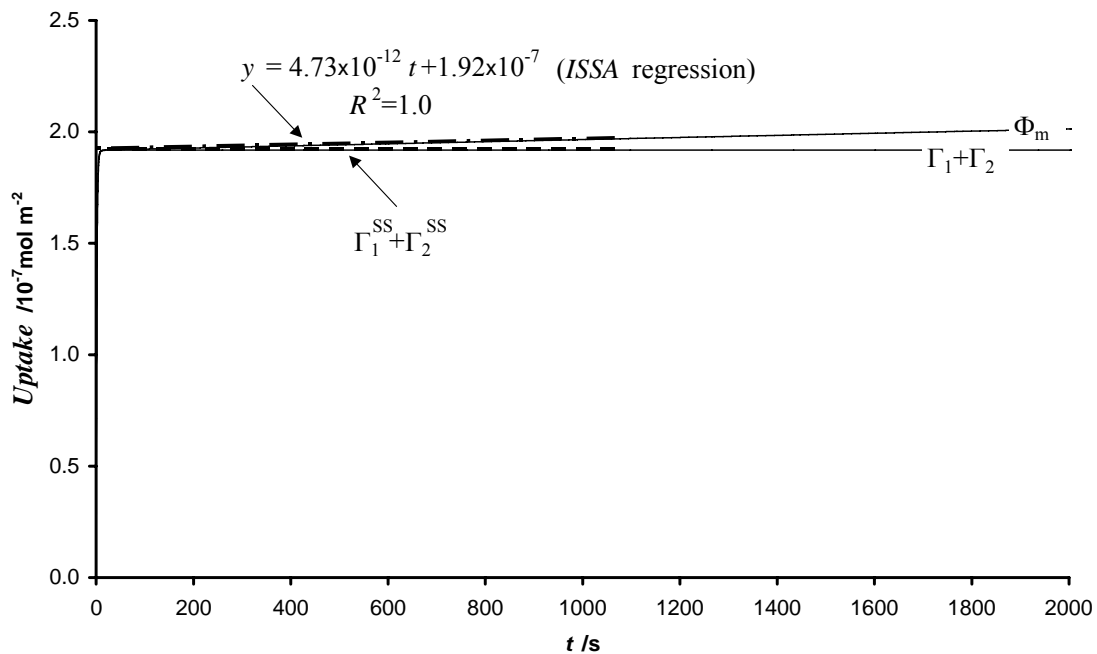


Fig 10.8 L'aplicació de l'aproximació de l'estat estacionari instantani (ISSA) a les dades de la càrrega total recupera satisfactòriament  $\Gamma_{SS}$  (línea discontinua) a través de l'ordenada a l'origen de la regressió lineal (línea discontinua amb punts). Tanmateix, es necessita informació addicional per recuperar tots els paràmetres del sistema. Paràmetres:  $D_M=9.45 \times 10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $c_M^*=2.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $r_0=1,8 \text{ }\mu\text{m}$ ,  $K_{M,1}=3.16 \times 10^{-3} \text{ mol m}^{-3}$ ,  $K_{M,2}=8.9 \times 10^{-3} \text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ ,  $\Gamma_{\max,1}=1.5 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $\Gamma_{\max,2}=6.6 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2}$ ,  $k_1=4.3 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  i  $k_2=0$ .

Com es pot veure en la figura 10.8 l'ajust de les dades de  $\Phi_m$  a una línia recta en l'interval  $t=11 \text{ s}$  i  $t=1000 \text{ s}$  permet obtenir satisfactòriament el flux d'estat estacionari (pendent= $4.73 \times 10^{-12} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  que representa el 99.9 % del valor veritable de  $J_m^{SS}$ ) i la

quantitat total adsorbida  $\Gamma^{SS}$  (ordenada a l'origen= $1.92 \times 10^{-7}$  mol m<sup>-2</sup> que representa el 99.9 % del veritable valor de  $\Gamma^{SS}$ ). A partir dels fluxos es poden extreure els valors del producte  $k_1 \cdot \Gamma_{max}$  i  $K_{M,1}$  dels pendents de les gràfiques a diferents valors de  $c_M^*$ . La resta de paràmetres, però, no es poden obtenir (amb garanties) dels valors de  $\Gamma^{SS}$  (trobat correctament), per culpa de que són molts i que afecten de forma conjunta en el valor final de  $\Gamma^{SS}$ . Quan els experiments de temps curts aportin dades transitòries de la càrrega total acumulada, certament ajudaran en la determinació dels paràmetres desitjats.

#### **10.6.2 Metodologia ISSA amb la fracció extreta corresponent a la quantitat adsorbida en un dels dos tipus de setis**

Slaveykova i Wilkinson (4) van utilitzar un procediment per discriminar les fraccions de la quantitat total de Pb ingerit per l'alga *Chlorella kesslerii*. El procediment es va utilitzar més tard en la bioassimilació del Zn (12) per la mateixa microalga. S'aïllaven les cèl·lules del medi experimental per filtració i es rentaven amb EDTA. Aquest rentat permetia la quantificació de la fracció "extractable", que els autors identificaven com la fracció adsorbida en els setis fisiològicament inactius i que denotem com  $\Gamma_2$  (vegeu la figura 10.9). La digestió posterior de les cèl·lules permetia la quantificació de la fracció "no-extractable", que inclou el metall ingerit per la cèl·lula i l'adsorbit en els setis "transportadors" i que denotem com  $\Phi_u + \Gamma_1$ . Representant la fracció no-extractable en front del temps i identificant l'ordenada de la recta de regressió com la quantitat de metall adsorbit en els setis de transport, obtenien informació posterior (addicional a  $\Gamma_2$  obtinguda de la fracció extractable) que els permetia trobar tots els paràmetres del sistema. Nosaltres hem procedit a valorar la seva metodologia amb l'ús del nostre programa pel règim transitori.

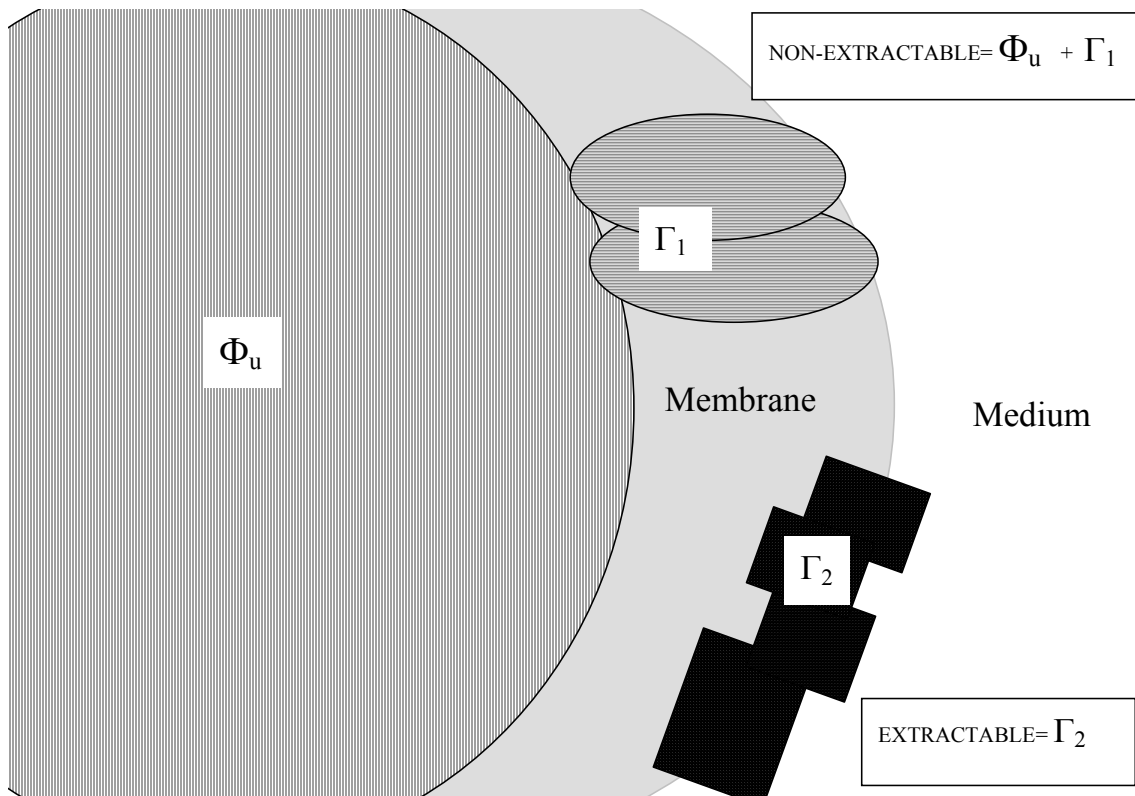


Figura 10.9 Esquema de la interpretació del procediment d'extracció de Wilkinson i col·laboradors (4,12,15-17) en la nomenclatura d'aquest treball. La càrrega total ( $\Phi_m$ ) és la suma de les fraccions extractable i no-extractable. L'extractable es considera la quantitat adsorbida en els llocs no actius ( $\Gamma_2$ ). La fracció no-extractable es considera la suma de la quantitat internalitzada ( $\Phi_u$ , que es pot anomenar també "cel·lular") i l'adsorbida en els setis actius ( $\Gamma_1$ ).

Les figures 10.8 i 10.10 mostren l'evolució amb el temps de les quantitats esperades quan s'utilitzen els paràmetres de Slaveykova i Wilkinson en el nostre model transitori.

La fracció extractable, després d'una ràpida pujada (en un temps fora de la possibilitat de determinació experimental), es manté pràcticament constant, indicant que  $\Gamma_2$  ha assolit un valor fix que identifiquem com  $\Gamma_2^{SS}$  (el valor calculat directament és  $1.92 \times 10^{-7}$  mol m<sup>-2</sup>). Aquest valor, junt amb l'equació (10.3) aporta una nova relació per cada  $c_M^*$ ,

ja que la constant de velocitat d'internalització de la *Chlorella* pel plom és prou baixa

per permetre aproximar  $c_M^{SS}$  per  $c_M^*$  i, així,  $\Gamma_2^{SS} \approx \Gamma_{\max,2} \frac{c_M^*}{K_{M,2} + c_M^*}$ . Així, els paràmetres

$K_{M,2}$  i  $\Gamma_{\max,2}$  es poden determinar satisfactòriament.

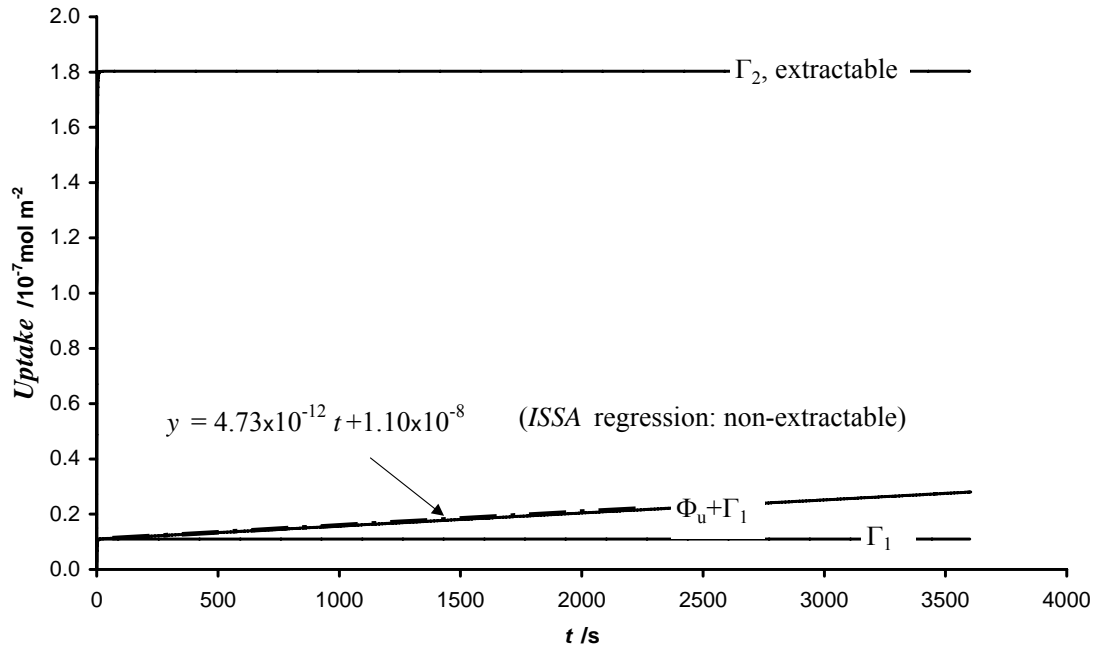


Figura 10.10: Aplicació satisfatòria de ISSA amb les dades corresponents a la fracció no-extractable: l'ordenada dona  $\Gamma_1^{SS}$  (4). El valor pràcticament constant de la fracció extractable ( $\Gamma_2$ , en la part superior del gràfic) dona  $\Gamma_2^{SS}$ . Mateixos paràmetres que en la figura 10.8.

Com s'ha vist a la figura 10.10, la fracció no extractable també exhibeix una pujada sobtada a temps molt curt i la regressió lineal, per les dades corresponents a temps llargs (i.e. ja en l'estat estacionari), proporciona una ordenada a l'origen pràcticament igual a  $\Gamma_1^{SS}$  (el valor computat directament dona  $1.10 \times 10^{-8} \text{ mol m}^{-2}$ ). D'aquesta regressió es poden trobar la resta de paràmetres. En conclusió, la metodologia de Slaveykova i Wilkinson és consistent amb el model transitori desenvolupat aquí i pot ser usat amb èxit (al menys per algun conjunt de paràmetres) per obtenir informació del sistema.

La raó que hi ha darrera de la seva aproximació, que es podria veure com un altra forma d'Aproximació de l'Estat Estacionari Instantani és conseqüència dels fets següents: i) l'estat estacionari s'assoleix molt ràpidament, de manera que totes les dades experimentals corresponen a aquest règim i, d'aquesta manera, la adsorció  $\Gamma_1$ , que està

inclosa en la fracció no-extractable, és  $\Gamma_1^{SS}$ . ii) sota condicions d'estat estacionari, la velocitat d'acumulació és  $J_m^{SS}$ .

### 10.6.3 Un refinament de la metodologia ISSA

Per temps suficientment llargs, l'expressió asimptòtica per la quantitat no extractable  $\Gamma_1 + \Phi_u$  es pot escriure com:

$$\Gamma_1(t) + \Phi_u(t) \approx (\Gamma_1^{SS} + \Phi_u(t_0)) + J_m^{SS}(t - t_0) = [\Gamma_1^{SS} + \Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0] + J_m^{SS} \cdot t \quad (10.16)$$

on  $t_0$  indica qualsevol instant prop de l'estat estacionari i  $t > t_0$ . Per propòsits pràctics, en la majoria de les metodologies experimentals es pot considerar que  $t_0$  és el temps de la primera mesura.

L'expressió (10.16) permet distingir el que podríem anomenar la interpretació "simple" de l'ordenada ISSA de una interpretació "refinada". En la interpretació "simple", l'ordenada s'agafa com a valor de  $\Gamma_1^{SS}$ , que correspon a assumir implícitament que la diferència  $\Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0$  és negligible en comparació amb  $\Gamma_1^{SS}$ . Òbviament, en algunes circumstàncies, l'aplicació d'aquest ISSA "simple" pot portar a errors en la recerca dels paràmetres correctes. Més endavant analitzarem alguns exemples d'aquests cassos i indicarem com una interpretació "refinada" basada en l'expressió (10.16) pot usar-se amb èxit per extraure paràmetres acceptables del l'ordenada trobada experimentalment. En la metodologia ISSA "refinada", l'aproximació consisteix en: a) agafar la quantitat acumulada experimental com la correcta de l'estat estacionari (i.e. el terme "*Instantani*" en el context d'aquesta aproximació refinada significa només que ja s'ha assolit aquest règim quan s'han fet les mesures) i b) identificar l'ordenada de la regressió lineal d'aquestes dades amb l'ordenada de l'expressió asimptòtica (10.16).

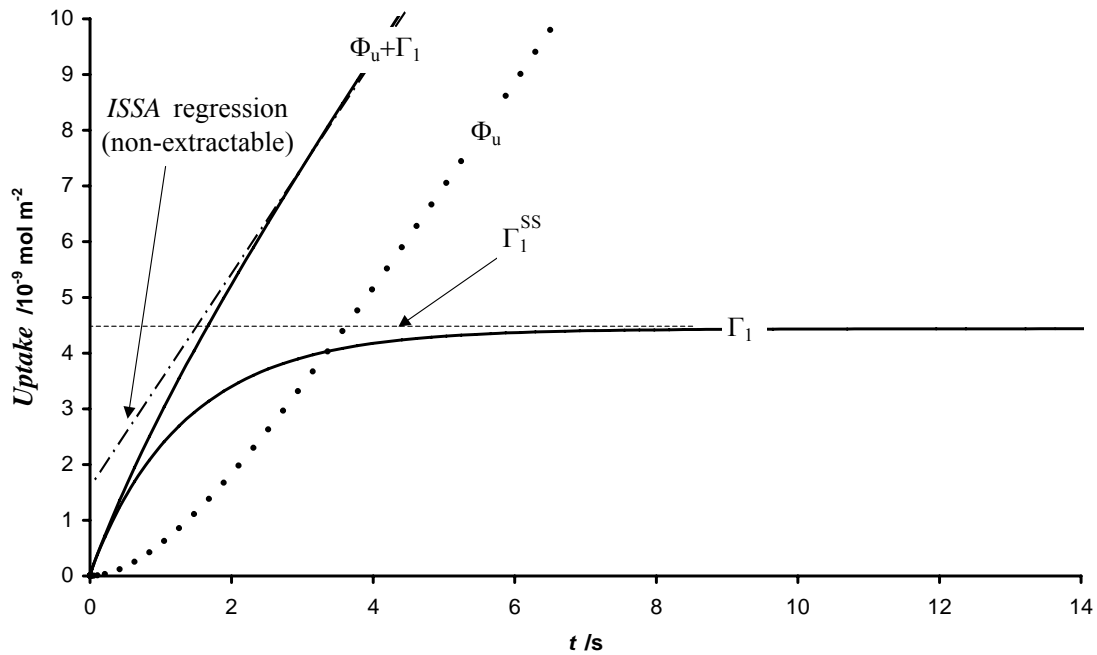


Figura 10.11 Exemple d'una aplicació enganyosa d'ISSA usant només una interpretació "simple". L'error prové de l'impacte del règim transitori en les quantitats acumulades, fins i tot quan l'estat estacionari ja s'ha assolit. La línia contínua superior correspon a les dades experimentals simulades de la quantitat no-extractable. L'ordenada de la regressió lineal ajustant valors d'estat estacionari és molt més baixa que el valor veritable de  $\Gamma_1^{SS}$  (línia horitzontal discontinua). Mateixos paràmetres que en la figura 10.6 excepte  $c_M^* = 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$  i  $k_1 = 0.43 \text{ s}^{-1}$ .

Cal observar que l'ordenada de la regressió ISSA (per la fracció no extractable) hauria de correspondre al terme entre parèntesi quadrats en l'equació (10.16), on hi ha un terme substractiu que involucra a  $J_m^{SS}$ . Si  $k_1$  és gran (fins i tot dins del rang reportat en la literatura (1)),  $J_m^{SS}$  pot ser gran, i un retard no detectable en l'acostament a l'estat estacionari pot fer que la diferència  $\Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0$  sigui no negligible en comparació amb  $\Gamma_1^{SS}$ . Això s'il·lustra en la figura 10.11: el valor de l'ordenada ISSA (trobat per regressió lineal en l'interval de 10 s fins a 900 s) és  $1.83 \times 10^{-9} \text{ mol m}^{-2}$ , mentre que el valor esperat és  $\Gamma_1^{SS}$  és  $4.44 \times 10^{-9} \text{ mol m}^{-2}$ , el que implica un error al voltant de 59%. Més apropiadament, aquest valor erroni podria haver-se sospitat ja que el valor associat



a  $K_{M,1}$  obtingut de diferents ordenades a diferents valors de  $c_M^*$  no casa amb el valor de  $K_{M,1}$  obtingut dels pendents de les regressions (i.e. els fluxos). Aquesta sospita s'hauria pogut elucidar usant el programa numèric d'aquest treball: si els paràmetres recuperats (amb la interpretació "simple" de ISSA) porten a valors esperats de les quantitats no extractables (a diferents temps de mesura) diferents de les quantitats trobades experimentalment, aleshores o bé el model no és adequat o els paràmetres trobats no són correctes. Si suposem que el model és correcte, podem aleshores millorar els paràmetres trobant numèricament la incògnita  $\Gamma_{\max,1}$  amb el ISSA "refinat":

$$\text{ordenada} = \Gamma_1^{\text{SS}} + \Phi_u(t_0) - J_m^{\text{SS}} \cdot t_0 \quad (10.17)$$

on  $\Gamma_1^{\text{SS}}$  és una funció de la incògnita ( $\Gamma_{\max,1}$ ) donada per la isoterma en l'equació (10.2)

i  $\Phi_u$  també és una funció de la incògnita ( $\Gamma_{\max,1}$ ) via el codi numèric. Una manera fàcil de resoldre l'equació (10.17) consisteix en seguir un procediment iteratiu (en el que suposem que coneixem tots els paràmetres excepte  $k_1$  i  $\Gamma_{\max,1}$ ):

i) Prenem  $\Gamma_1^{\text{SS}}$  de la primera iteració com l'ordenada (i.e. comencem aplicant la interpretació "simple" de ISSA).

ii) Apliquem l'equació (10.2) en la forma de l'estat estacionari

$$\frac{\Gamma_1^{\text{SS}}}{\Gamma_{\max,1}} = \frac{c_M^{\text{SS}}}{K_{M,1} + c_M^{\text{SS}}} \quad (10.18)$$

i trobem  $\Gamma_{\max,1}$  de la iteració ( $c_M^{\text{SS}}$  és pot calcular de (10.9) fent  $k_2=0$ ).

iii) Calculem  $k_1$  de la iteració, de manera que multiplicat pel valor  $\Gamma_{\max,1}$  de la iteració (trobat en el pas anterior) dóna el valor del producte de la  $k_1$  certa per la  $\Gamma_{\max,1}$  certa (aquest producte se suposa que és conegut de la regressió dels pendents a diferents  $c_M^*$ ).

iv) Si els valors de  $k_1$  i  $\Gamma_{\max,1}$  en aquesta iteració convergeixen suficientment amb els anteriors, s'atura el procés iteratiu.

v) Fem córrer el programa del model i calculem la diferència  $\Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0$  per un valor de  $t_0$  suficientment gran (i.e. tal que el sistema està pràcticament al règim estacionari). Usem l'equació (10.17) per trobar  $\Gamma_1^{SS}$  de la iteració següent. Es va al pas ii).

L'aplicació del procediment iteratiu a les dades (sintètiques) de la figura 10.11 es mostra a la taula 1, on podem observar una excel·lent recuperació dels paràmetres originals ( $k_1 = 0.43 \text{ s}^{-1}$  i  $\Gamma_{\max,1} = 1.50 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2}$ ).

Taula 10.1: Valors dels paràmetres obtinguts en el procediment iteratiu corresponent a ISSA refinat, aplicat a les dades de la figura 10.11.

	1ª iteració	2ª iteració	3ª iteració	4ª iteració	5ª iteració
$\Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0$	0 (simple ISSA)	$-2.48 \times 10^{-9}$	$-2.58 \times 10^{-9}$	$-2.59 \times 10^{-9}$	$-2.58 \times 10^{-9}$
$\Gamma_1^{SS} / \text{mol m}^{-2}$	$1.83 \times 10^{-9}$	$4.31 \times 10^{-9}$	$4.41 \times 10^{-9}$	$4.42 \times 10^{-9}$	$4.41 \times 10^{-9}$
$\Gamma_{\max,1} / \text{mol m}^{-2}$	$6.18 \times 10^{-8}$	$1.46 \times 10^{-7}$	$1.49 \times 10^{-7}$	$1.49 \times 10^{-7}$	$1.49 \times 10^{-7}$
$k_1 / \text{s}^{-1}$	1.04	0.44	0.43	0.43	0.43

Els valors de  $\Phi_u(t_0) - J_m^{SS} \cdot t_0$  obtinguts amb el programa numèric a  $t_0$  provenen de la regió 2700 s-3000 s on es mantenen constants fins a dues xifres decimals.

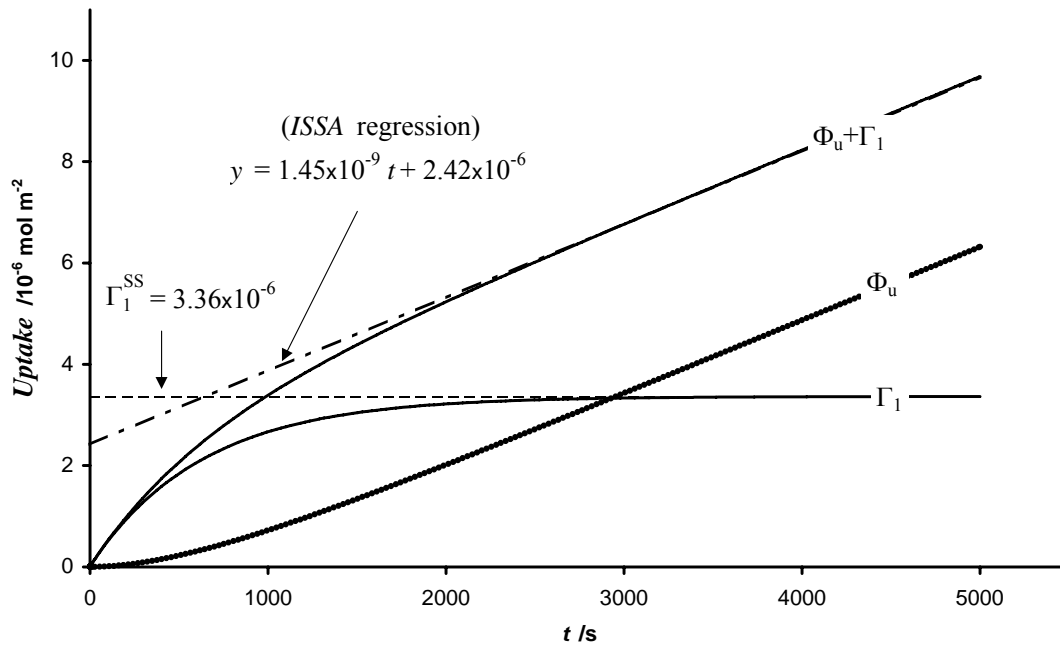


Figura 10.12 Com s'ha indicat en l'apartat 5, un nombre gran de setis de transport ( $\Gamma_{\max,1}$ ) pot portar a un valor de l'ordenada de la regressió lineal ISSA de les quantitats no-extractables que no representen la quantitat adsorbida d'estat estacionari  $\Gamma_1^{\text{SS}}$ . Paràmetres com en 10.6.

L'existència d'un nombre gran de setis fisiològicament actius (com se suggereix en (12) per cèl·lules prèviament acondicionades en un medi de cultiu amb una concentració molt baixa d'una espècie essencial) també pot representar un repte a l'aplicabilitat del ISSA "simple" a la fracció extractable. La figura 10.12 representa les quantitats acumulades d'un hipotètic cas extrem on  $\Gamma_{\max,1}$  s'ha incrementat 1000 vegades, amb  $r_0=18 \mu\text{m}$  i la resta de paràmetres com en la figura 10.10. Es pot observar que l'ordenada en la figura 10.12 és una estimació dolenta de  $\Gamma_1^{\text{SS}}$ . De fet, la figura 10.12 correspon al sistema mostrat en la secció 3 el qual encara no ha assolit el règim estacionari ni tan sols a 1000 s (Fig 10.6). El procediment iteratiu (corresponent a la ISSA refinada) destacat abans recupera els acceptables valors de  $k_1 = 1.48 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$  i  $\Gamma_{\max,1} = 4.37 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-2}$  en la cinquena iteració. Si aquest sistema triga tant en arribar a l'estat estacionari, aleshores és evident que la ISSA "simple" serà un predictor

dolent dels paràmetres del sistema. Això es destaca amb les dades mostrades en la figura 10.13, en la qual es mostra un cas més extrem i apareix una ordenada negativa.

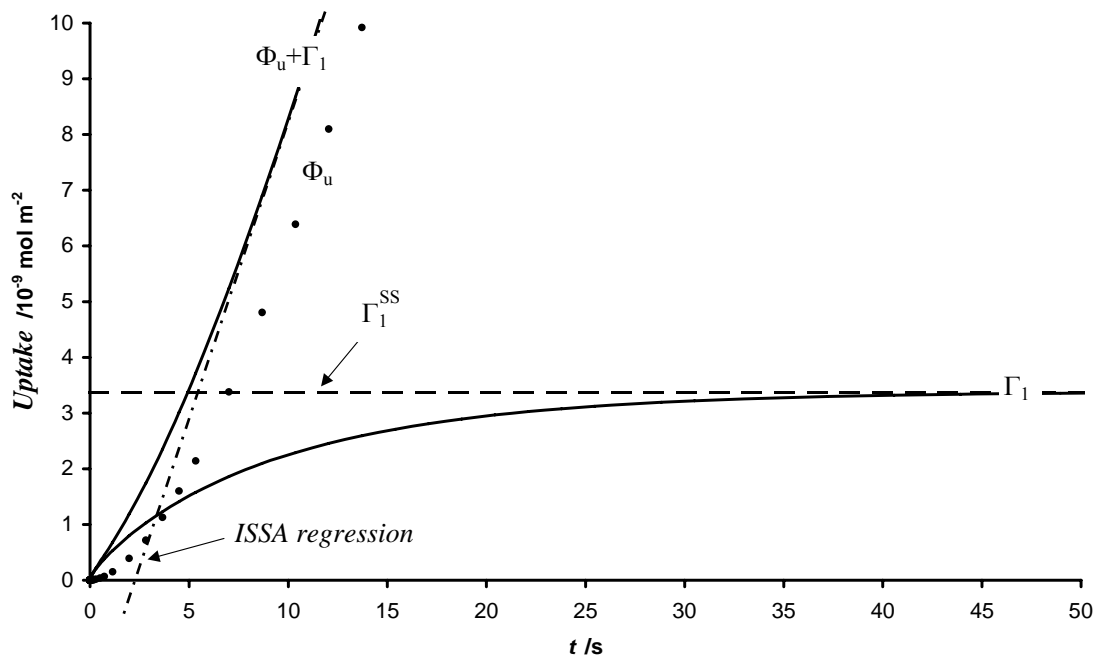


Fig 10.13 Fracàs evident de la metodologia ISSA amb la interpretació “simple” amb els mateixos paràmetres que en la figura 10.11 excepte per un radi més gran ( $r_0=18 \mu\text{m}$ ) donant un pendent negatiu. Els mateixos marcadors que en les figures anteriors.

En general, les capacitats predictives de l’aproximació ISSA “simple” decreixen a mesura que el microorganisme creix, com és d’esperar dels efectes de temps més llargs per arribar a l’estat estacionari. La figura 10.14 mostra l’impacte d’alguns paràmetres en la discrepància entre el valor esperat de  $\Gamma_1^{\text{SS}}$  i l’ordenada obtinguda amb l’aproximació ISSA “simple”. Es pot observar una remarcable dependència lineal de la constant de velocitat d’internalització.

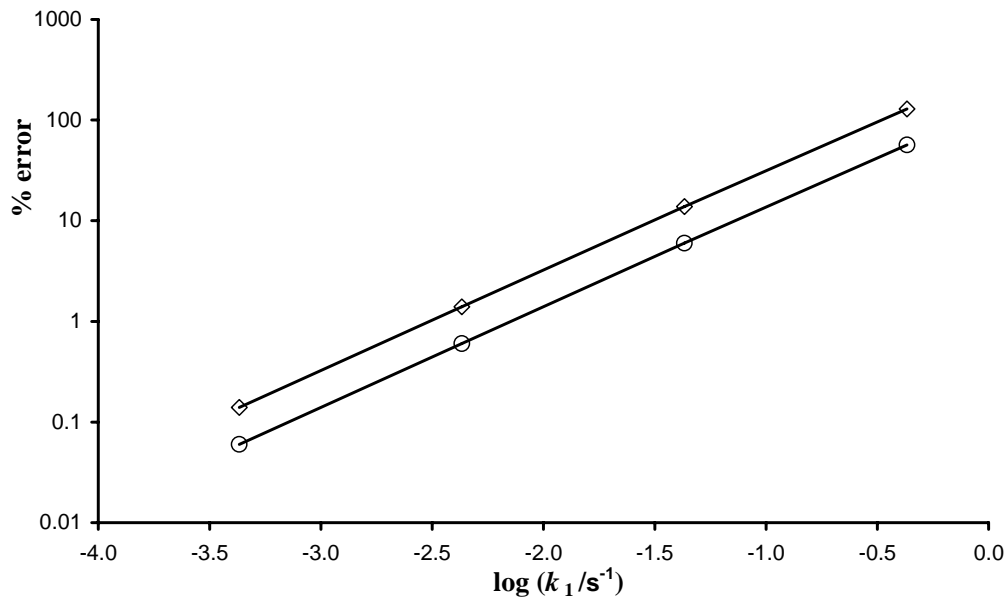


Figura 10.14 Representació del percentatge d'error en la determinació de  $\Gamma_1^{\text{SS}}$  a partir de les ordenades recuperades (metodologia ISSA amb interpretació "simple") en funció de la constant de velocitat d'internalització  $k_1$  per 2 radis diferents (1.8  $\mu\text{m}$  en cercles o i 18  $\mu\text{m}$  en rombes). Paràmetres com en la figura 10.8 amb  $c_M^* = 2.5 \times 10^{-4} \text{ mol m}^{-3}$ .

## 10.7 Conclusions

S'ha desenvolupat un model transitori per la bioassimilació que té en consideració la difusió i adsorció Langmuiriana en diferents setis d'internalització seguida de internalització de primer ordre. A través de la solució numèrica o les expressions analítiques associades, aquest model s'ha demostrat útil com un pas essencial en la millora de la comprensió de les característiques complexes de l'assimilació i en el disseny d'experiments per determinar paràmetres rellevants.

S'ha obtingut una expressió aproximada (equació (10.9)) per calcular la concentració a la superfície de la cèl·lula (necessària per constants de velocitat d'internalització grans) a partir de la qual es poden trobar expressions pel flux. Aquesta expressió també

---

conduïx a una bona estimació (donada per l'equació (10.12)) del temps necessari per arribar a la proximitat del 95% de l'estat estacionari.

S'ha demostrat la validesa de la interpretació d'estat estacionari del flux a valors típics de temps de mesura i dels paràmetres del sistema, alhora que l'impacte del règim transitori en les quantitats acumulades.

La solució numèrica desenvolupada aquí per tot el règim transitori és particularment útil per valorar les potencialitats i limitacions de l'aproximació ISSA. Obtenir el conjunt complet de paràmetres del model amb les dades de la càrrega total a l'estat estacionari és difícil a causa del desequilibri entre el gran nombre de paràmetres incògnita i pràcticament només una línia recta com a única informació de les dades experimentals.

La interpretació "simple" de l'estratègia ISSA amb informació addicional obtinguda d'un procés d'extracció ha demostrat que dona bons resultats, sempre que la velocitat d'internalització sigui baixa. Tanmateix, cal tenir cura de possibles valors incorrectes de les ordenades ISSA, sobre tot a valors grans de les constant de velocitat d'internalització i/o valors grans dels radis (pels quals es tarda més en assolir el règim estacionari). En aquest sentit, destaquem l'equació com una bona ajuda per assignar un significat físic a l'ordenada de l'estratègia ISSA i la gran utilitat de disposar el model de tot el transitori per constatar la consistència de la metodologia aplicada i per trobar els paràmetres desitjats amb un procés iteratiu

## 10.8 Referències

1. Wilkinson, K. J.; Buffle, J. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester, UK, 2004; pp 445-533.
2. Galceran, J.; van Leeuwen, H. P. In *Physicochemical kinetics and transport at chemical-biological surfaces. IUPAC Series on Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems*; van Leeuwen, H. P., Koester, W., Eds.; John Wiley: Chichester, UK, 2004; pp 147-203.
3. Sunda, W. G.; Huntsman, S. A. Feedback interactions between zinc and phytoplankton in seawater. *Limnol.Oceanogr.* **1992**, *37*, 25-40.
4. Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ.Sci.Technol.* **2002**, *36*, 969-975.
5. Tessier, A.; Buffle, J.; Campbell, P. G. C. In *Chemical and Biological Regulation of Aquatic Systems*; Buffle, J., DeVitre, R. R., Eds.; Lewis Publishers: Boca Raton, FL, 1994; pp 197-230.
6. Campbell, P. G. C. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*; Tessier, A., Turner, D. R., Eds.; John Wiley & Sons: Chichester, 1995; pp 45-102.
7. Hudson, R. J. M. Which aqueous species control the rates of trace metal uptake by aquatic biota? Observations and predictions of non-equilibrium effects. *Sci.Total Envir.* **1998**, *219*, 95-115.
8. Campbell, P. G. C.; Errecalde, O.; Fortin, C.; Hiriart-Baer, W. R.; Vigneault, B. Metal bioavailability to phytoplankton - applicability of the Biotic Ligand Model. *Comp.Biochem.Physiol.C* **2002**, *133*, 189-206.
9. Hudson, R. J. M.; Morel, F. M. M. Iron transport in marine-phytoplankton - kinetics of cellular and medium coordination reactions. *Limnol.Oceanogr.* **1990**, *35*, 1002-1020.
10. Jansen, S.; Blust, R.; van Leeuwen, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Zn(II) and Cd(II) uptake by mussel (*Mytilus edulis*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Environ.Sci.Technol.* **2002**, *36*, 2164-2170.
11. Fortin, C.; Campbell, P. G. C. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environ.Toxicol.Chem.* **2000**, *19*, 2769-2778.
12. Hassler, C. S.; Wilkinson, K. J. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ.Toxicol.Chem.* **2003**, *22*, 620-626.
13. Galceran, J.; Monné, J.; Puy, J.; van Leeuwen, H. P. The impact of the transient uptake flux on biouptake accumulation. Linear adsorption and first-order internalisation coupled with spherical semi-infinite mass transport. *Mar.Chem.* **2004**, *85*, 89-102.
14. Lippemeier, S.; Hintze, R.; Vanselow, K. H.; Hartig, P.; Colijn, F. In-line recording of PAM fluorescence of phytoplankton cultures as a new tool for studying effects of fluctuating nutrient supply on photosynthesis. *Eur.J.Phycol.* **2001**, *36*, 100-
15. Wilkinson, K. J.; Slaveykova, V. I.; Hassler, C. S.; Rossier, C. Physicochemical mechanisms of trace metal bioaccumulation by microorganisms. *Chimia* **2002**, *56*, 681-684.
16. Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Some fundamental (and often overlooked) considerations underlying the free ion activity and biotic ligand models. *Environ.Toxicol.Chem.* **2004**, *23*, 283-291.
17. Hassler, C. S.; Slaveykova, V. I.; Wilkinson, K. J. Discriminating between intra- and extracellular metals using chemical extractions. *Macromolecular Chemistry and Physics* **2004**, *2*, 237-247.

- 
18. van Leeuwen, H. P.; Pinheiro, J. P. Speciation dynamics and bioavailability of metals. Exploration of the case of two uptake routes. *Pure Appl.Chem.* **2001**, *73*, 39-44.
  19. Whitfield, M.; Turner, D. R. In *Chemical Modeling in Aqueous Systems*; Jenne, E. A., Ed.; American Chemical Society: Washington DC, 1979; pp 657-680.
  20. Pinheiro, J. P.; Galceran, J.; van Leeuwen, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Bulk depletion effects. *Environ.Sci.Technol.* **2004**, *38* , 2397-2405.
  21. van Leeuwen, H. P. Metal speciation dynamics and bioavailability: Inert and labile complexes. *Environ.Sci.Technol.* **1999**, *33*, 3743-3748.



# Capítol 11

Fluxos iònics a través de  
canals en monocapes. Càlcul de la  
permeabilitat a partir dels corrents

Part d'aquest capítol ha estat publicat a

**Langmuir** 19 (2003) 4694-4700

## **11. Fluxos iònics a través de canals en monocapes. Càlcul de la permeabilitat variable a partir dels corrents.**

### **11.1 Introducció**

El transport d'ions a través de canals i la seva dinàmica conformacional tenen una gran importància in diversos processos fisiològics. Des dels treballs de Hodgkin i Huxley(1) sobre la transmissió dels impulsos nerviosos, s'han fet nombrosos esforços per modelar la dinàmica dels canals iònics(2) i el transport en ells(3) i el nostre coneixement i comprensió d'aquests processos ha millorat enormement. Malgrat això, fins el moment no s'havia considerat col·lectivament la combinació de tres processos claus en un sol model. Els tres processos són: (i) la difusió d'un ió cap a la superfície de la monocapa (on hi ha una sèrie de canals); (ii) la dinàmica conformacional dels canals individuals i (iii) el pas del ió a través dels canals. Una aproximació global com aquesta té una rellevància particular ja que la transferència d'ions des del medi, a través de la membrana cel·lular i fins a l'interior de la cèl·lula és de particular importància pels estudis de la ingesta fisiològica dels ions, per exemple (4). Per això, s'ha seguit un programa de treball per intentar modelar el passatge dels ions a través d'un conjunt de canals iònics tenint en compte tots els processos involucrats en el transport.

Per tal de desenvolupar un marc interpretatiu matemàtic adequat, és necessari disposar d'un sistema experimental ben caracteritzat per poder validar-lo. Fa uns anys es va introduir una tècnica electroquímica que s'aplica a un sistema consistent en una monocapa fosfolipídica sobre un elèctrode de mercuri, en la que s'incorporen canals monomoleculars de gramicidina (5).

L'evidència experimental extreta dels transitoris dels polsos de potencial sembla donar suport a una descripció en la que la gramicidina activa conductora estava en equilibri amb una gran concentració de gramicidina no conductora en la capa (6). La distribució

de gramicidina activa i no activa variava amb el potencial aplicat; per tant, a continuació d'un pols de potencial s'observava una etapa transitòria de relaxació corresponent al restabliment de l'equilibri entre les formes conductora i no conductora de la gramicidina. En aquell moment es va aplicar un model semi-quantitatiu al sistema relacionant les constants de velocitat rellevants al corrent del transitori. Malgrat això, el sistema requeria un tractament físico-químic més rigorós, per tal de millorar la comprensió dels fenòmens involucrats i la seva interrelació.

És convenient, per tant, el desenvolupament de models de canals iònics que puguin ser aplicats als experiments electroquímics de canals iònics. En aquest capítol es descriu la formulació del model considerant la difusió i la translocació dels ions a la monocapa i l'aplica als resultats obtinguts en el sistema experimental de l'elèctrode de mercuri recobert amb una monocapa de fosfolípids amb canals de gramicidina.

## 11.2 Sistema experimental

La deposició de la monocapa de fosfolípid (Dioleoyl phosphatidylcholine DOPC de Lipid Products, UK) sobre l'elèctrode de mercuri i la incorporació dels canals de gramicidina en la monocapa per addició de Gramicidina D (Sigma chemicals) a l'electròlit està ben descrita a la literatura(5) i a l'apartat 3.4.1 del capítol 4 d'aquest treball (6-8). La gramicidina D és una barreja: 72% gramicidina A, 9% gramicidina B i 19% gramicidina C. S'usa la reacció redox del  $Tl^+/Tl(Hg)$  per investigar l'activitat conductora d'aquests canals. Els trets fonamentals d'aquest sistema s'il·lustren a la part esquerra de la figura 11.1. És important observar que els canals de gramicidina es difonen en dues dimensions i se suposa que tenen una mobilitat similar a la del fosfolípid amb un coeficient de difusió de  $10^{-10} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  (9).

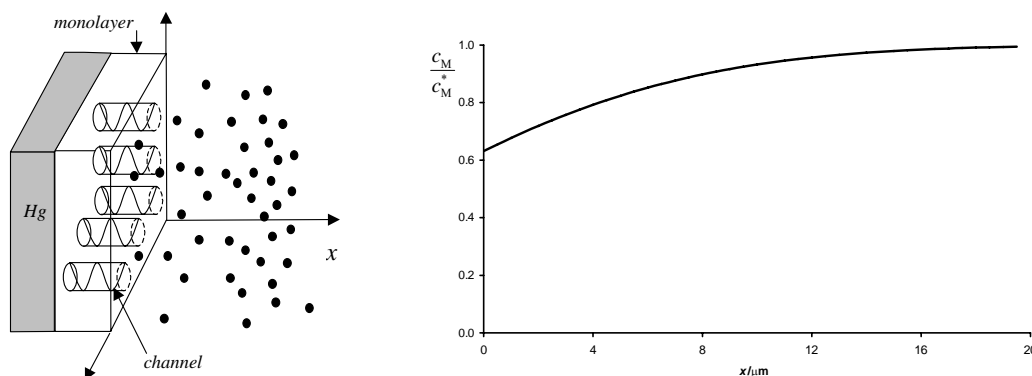


Figura 11.1: Descripció esquemàtica del sistema modelat mostrant la monocapa de lípid que inclou els canals iònics cap als que es difon l'espècie permeant (representada amb cercles plens). La superfície de la capa monolipídica del costat de la solució correspon al pla  $x=0$  en un sistema real tridimensional. En el model,  $x$  és l'única coordenada rellevant. La concentració  $c_M(x_1, t)$  en el model, representa el promig de les concentracions a  $x=x_1$  en un espai tridimensional. També es representa un perfil típic de concentració segons el model.

Com a tècnica experimental s'ha usat la cronoamperometria amb polsos de potencials en la regió del corrent límit de reducció del  $Tl^+$  sobre un elèctrode de Hg no recobert (6). Els potencials s'han mesurat respecte un elèctrode de referència de Ag/AgCl 3.5 mol  $dm^{-3}$ .

### 11.3 Aproximació teòrica a la conducció

#### 11.3.1 Formulació matemàtica per una permeabilitat genèrica $P(t)$

Sigui M l'espècie electroactiva permeant que arriba a la superfície de l'elèctrode difonent-se des del si de la dissolució i travessant la monocapa lipídica a través dels canals. En geometria plana, el procés de difusió en la solució es pot descriure per:

$$\frac{\partial c_M(x, t)}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 c_M(x, t)}{\partial x^2} \quad (11.1)$$

on  $D_M$  es refereix al coeficient de difusió de l'espècie M. L'origen de coordenades de l'aproximació mono dimensional es pren a la interfície monocapa-solució (vegeu la figura 11.1). Suposar una geometria plana és raonable ja que l'extensió de la capa de difusió és extremadament petita (degut a la curta escala de temps de l'experiment, 40

ms) en comparació amb el radi de la gota de l'elèctrode (0.265 mm). Un fet més important és que s'usa l'aproximació d'un camp mig que suavitza de forma homogènia, o escampa uniformement: a) la concentració del ió permeant a qualsevol  $x$  (fins i tot, la superfície de la monocapa a  $x=0$ ) i b) tots els setis conductors a la superfície de la monocapa, fent així possible una formulació macroscòpica mono dimensional. Aquesta aproximació prometja la superposició de les esferes de difusió amb els porus (que apareix a escales de temps molt curtes) i el moviment lateral dels porus. Aquesta aproximació també ha estat utilitzada per altres estudis sobre sistemes similars (10).

Suposant difusió semiinfinita (condició de contorn  $\lim_{x \rightarrow \infty} c_M = c_M^*$ ; que és raonable donat el volum de la solució de  $50 \text{ cm}^3$  i el temps curt de l'experiment cronoamperomètric), i un perfil inicial homogeni  $c_M^*$ , es pot demostrar (11-14) que existeix una relació entre el flux i la concentració de l'espècie electroactiva a  $x=0$  sobre la superfície solució/monocapa:

$$c_M^* - c_M(0, t) = \int_0^t \frac{\sqrt{D_M} \left( \frac{\partial c_M(x, t)}{\partial x} \right)_{x=0}}{\sqrt{\pi(t - \tau)}} d\tau \quad (11.2)$$

on l'expressió pel flux deriva de

$$-J_M(x, t) = D_M \cdot \left( \frac{\partial c_M(x, t)}{\partial x} \right) \quad (11.3)$$

Se suposa que la monocapa no acumula quantitats apreciables de M (10,15) ni al seu interior (per tant, el gruix de la capa és irrellevant pel nostre model) ni en cap mena de forma adsorbida en la interfície monocapa-solució. Això és consistent amb els resultats de treballs anteriors (5,7,8) on els voltamogrames cíclics del parell  $\text{TI}^+/\text{TI}(\text{Hg})$  als elèctrodes recoberts amb fosfolípids modificats amb gramicidina no mostren evidències

d'adsorció ni d'acumulació de  $Tl^+$  a sobre ni a l'interior de la monocapa respectivament. Així, l'absència d'acumulació implica que el corrent mesurat (considerat positiu) prové del flux entrant de M a  $x=0$ :

$$I(t) = nFAD_M \left( \frac{\partial c_M(x,t)}{\partial x} \right)_{x=0} \quad (11.4)$$

on  $n$  és el nombre d'electrons intercanviats,  $F$  el Faraday i  $A$  l'àrea de l'elèctrode.

És destacable que, degut a la naturalesa del primer procés (el transport de l'espècie permeant per difusió cap a la superfície), combinant les equacions (11.2) i (11.4), es pot tenir accés experimental a la concentració (promig) de M a la superfície a partir dels corrents mesurats. La figura 11.2 mostra com  $c_M(0,t)$  disminueix amb el temps; aquesta variació pot ser una informació valuosa a tenir en compte en la modelització dels processos restants.

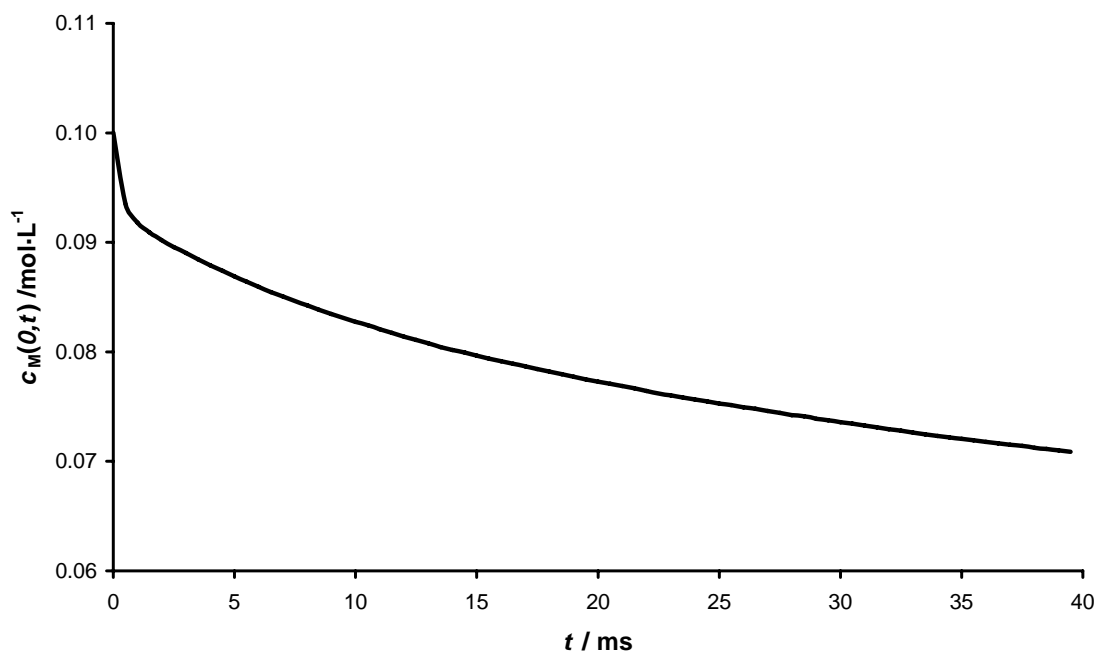


FIGURA 11.2: Gràfic de l'evolució de la concentració del permeant a la interfície lípid-solució calculada usant l'equació (11.2) amb els corrents experimentals obtinguts a un potencial de  $E = -0.5$  volts, concentració "bulk"  $[Tl]^* = 10^{-4}$  M i prenent  $D_M = 2.00 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$  i  $nFAc_M^* = 8.49 \times 10^{-3} \text{ Cm}^{-1}$

Un altre concepte clau que resultarà molt útil és la definició de la permeabilitat (local)

com la relació entre el flux i la concentració, ambdós a la interfície monocapa-solució:

$$P(t) \equiv D_M \cdot \left( \frac{\partial c_M(0,t)}{\partial x} \right)_{x=0} / c_M(0,t) \quad (11.5)$$

La permeabilitat així definida és una variable operacional, no associada a cap suposició i, com veurem més endavant,  $P(t)$  és accessible experimentalment sempre i quan es doni difusió semi-infinita sense acumulació. Efectivament, la combinació de les equacions (11.2)-(11.5), porta a:

$$P(t) \cdot \left[ nFAc_M^* - \frac{1}{\sqrt{\pi \cdot D_M}} \int_0^t \frac{I(\tau) d\tau}{\sqrt{t-\tau}} \right] = I(t) \quad (11.6)$$

A més de poder ser calculada a partir dels corrents experimentals,  $P(t)$  pot ser modelada, per exemple, combinant un model pel procés ii (el nombre de canals actius) i un model pel procés iii (la cinètica del pas pels canals).

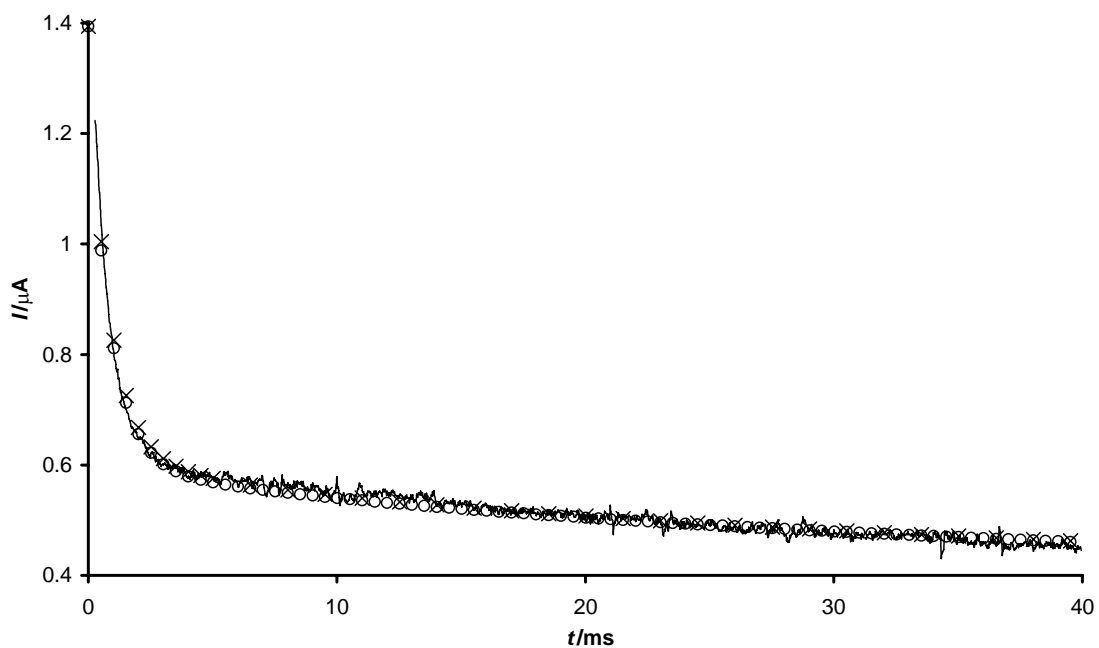


FIGURA 11.3 : Gràfiques de les dades experimentals del corrent en front el temps (línea fluctuant) i corrent simulat amb l'equació (11.18) (marcador o) o l'equació (11.20) (marcador x) usant els paràmetres  $P_\infty = 7.71 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ;  $P_\Delta = 8.92 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ;  $k_\Sigma = 1141 \text{ s}^{-1}$  i la resta de paràmetres com en la figura 11.2.



L'equació integral (11.6) és pot usar, doncs, de dues maneres:

- a) Donada una dependència funcional coneguda (o suposada a partir d'un model) de  $P(t)$ , es pot calcular el corrent esperat en qualsevol moment (vegeu la secció 3.2 d'aquest capítol).
- b) Donat un corrent experimental  $I(t)$ , es pot trobar la funció  $P(t)$ . Amb aquesta aproximació, pot obtenir-se la dependència temporal de  $P(t)$  a partir d'un conjunt de dades corrent-temps experimentals a partir de l'equació (11.6) (que pot ser considerada com una semi-integració (II) de les dades del corrent). Per exemple, aplicant l'equació (11.6) als corrents experimentals de la figura 11.3, s'obté  $P(t)$  (vegeu la línia contínua a la figura 11.4) que mostra una mena de decaïment exponencial amb el temps. En general, quan s'ha calculat una sèrie de valors de permeabilitat a temps diferents, es poden aplicar processos ordinaris d'ajust per trobar els paràmetres de la funcionalitat que s'ha suposat per  $P(t)$ .

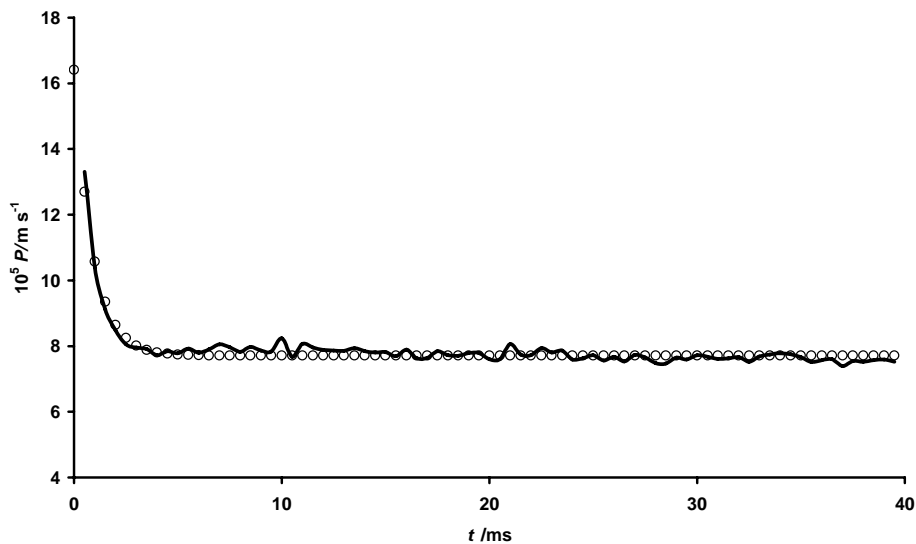


FIGURA 11.4 : Gràfic dels valors experimentals de la permeabilitat (usant l'equació (11.6) i els corrents de la figura 11.3) en front el temps (línea fluctuant). Els cercles buits corresponen a la  $P$  ajustada donada per l'expressió (11.17) amb els mateixos paràmetres que en la figura 11.3

### 11.3.2 Model senzill per $P(t)$ basat en una interconversió de primer ordre dels canals iònics no conductors i conductors, acoblada amb una cinètica heterogènia de primer ordre pel pas pels canals

#### 11.3.2.1 De la base física a l'expressió matemàtica

Introduïm ara algunes hipòtesis addicionals per construir un model molt simple per  $P(t)$  compatible amb les dades experimentals (com els corrents de la figura 11.3).

Nombrosos treballs previs demostren que la gramicidina existeix en dues formes: una forma activa conductora que és l'espècie (16) monomolecular(17)  $\beta^{6.3}$  i una forma inactiva, no conductora (que podria ser, en realitat, una col·lecció d'espècies com agregats de gramicidina(18,19), formes de doble fil (20) o hèlix (16,21) en alguna orientació amb l'eix del canal paral·lel a la superfície). Les espècies activa i no activa les representem amb els símbols  $Gr^*$  i  $Gr$  respectivament. Suposem, llavors, que el model pel procés ii considera la conversió d'una forma en l'altra seguint una cinètica de primer ordre amb constants  $k_+$  per l'activació, i  $k_-$  per la desactivació (6):



Per aquest procés en la superfície, podem escriure la següent equació cinètica

$$\frac{d[Gr^*]}{dt} = k_+[Gr] - k_-[Gr^*] \quad (11.8)$$

La solució d'aquest esquema cinètic porta a

$$[Gr^*] = [Gr^*]_{\infty} + ([Gr^*]_0 - [Gr^*]_{\infty}) e^{-k_{\Sigma} t} \quad (11.9)$$

on

$$k_{\Sigma} \equiv k_+ + k_- \quad (11.10)$$

pot ser considerada com una velocitat total de decaïment (igual a la suma de les constants individuals) de la gramicidina des d'una concentració inicial (a la superfície)  $[Gr^*]_0$  fins un valor d'equilibri  $[Gr^*]_{\infty}$  (i.e. quan el temps tendeix a infinit).

Previ a l'aplicació d'un pols de potencial a  $t=0$ , la gramicidina conductora existeix com una fracció de la gramicidina total en la monocapa i està en equilibri amb les espècies no conductores de gramicidina(21). La interpretació física de l'equació (11.9) és que, a continuació del pols de potencial s'estableix un nou equilibri entre les espècies de gramicidina. L'assoliment d'aquest equilibri comporta un temps finit de relaxació durant el qual canvia el nombre de canals de gramicidina conductors. Malgrat la neutralitat global de la molècula de gramicidina, hi ha càrregues parcials localitzades (22) responsables del canvi en la permeabilitat amb el potencial aplicat. Aquesta imatge física és consistent amb experiments preliminars (no mostrats aquí) en els quals s'apliquen polsos de potencial a una monocapa modificada amb gramicidina en absència de  $Tl^+$ . El corrent transitori resultant, de tipus exclusivament capacitiu, mostra una "cua" quan el comparem amb el corrent transitori que resulta dels mateix experiment dut a terme sobre una capa de lípid pura. Aquesta "cua" del corrent de càrrega suggereix alguna mena de canvi conformacional de la gramicidina.

Suposem, ara, una cinètica heterogènia de primer ordre pel pas a través del canal (procés iii), representat per l'esquema:



on  $M_{\text{solució}}$  es refereix a M a la superfície lípid-solució i  $M_{\text{internalitzat}}$  correspon a l'espècie permeant internalitzada (o amalgamada) i  $k_2$  és la constant de velocitat heterogènia. Aquest model particular pel procés iii pot ser considerat com una extensió de l'enfocament usual (7,23-25) o un cas específic d'altres propostes més complexes (6,8,10,26). La velocitat d'internalització (mesurada com a corrent) és:

$$I(t) = nFAk_2 [Gr^*] c_M(0,t) \quad (11.12)$$

La combinació d'aquesta expressió amb la definició de la permeabilitat en l'equació (11.5), porta a

$$P(t) = \frac{I(t)}{nFAc_M(0,t)} = k_2 [Gr^*] \quad (11.13)$$

que permet la interpretació (dins d'aquest model pel procés iii) de la  $P(t)$  accessible experimentalment com una mesura proporcional al nombre de canals actius.

Amb aquesta combinació específica de models pels procés iii i el procés ii,  $P(t)$  s'obté de l'equació cinètica (11.12) juntament amb el nombre prescrit de canals actius de gramicidina facilitat per l'equació (11.9):

$$P(t) = k_2 \cdot [Gr^*] = k_2 \cdot [Gr^*]_\infty + (k_2 [Gr^*]_0 - k_2 \cdot [Gr^*]_\infty) e^{-k_2 \cdot t} \quad (11.14)$$

Definim

$$P_\infty \equiv k_2 \cdot [Gr^*]_\infty \quad (11.15)$$

(permeabilitat a temps infinit) i

$$P_\Delta \equiv k_2 \cdot ([Gr^*]_0 - [Gr^*]_\infty) \quad (11.16)$$

de manera que  $P_\Delta$  es pot interpretar físicament com el canvi de  $P(t)$  des de  $t=0$  fins  $t=\infty$ . Aleshores, es troba que la combinació del model d'interconversió de la gramicidina i el model de cinètica heterogènia de primer ordre porten a la funcionalitat:

$$P(t) = P_\infty + P_\Delta \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (11.17)$$

que és consistent amb el decreixement exponencial observat en la figura 11.4. A partir d'aquí, ens referirem a aquesta combinació de models associada a l'equació (11.17) com "Permeabilitat Decaïent Exponencialment" ("Exponentially Decaying Permeability"):

EDP). A més, la figura 11.4 mostra també que  $P(t)$  tendeix a un valor constant després dels primers pocs mil·lisegons. Això és interessant i mostra que després d'un temps curt inicial la translocació del  $Tl^+$  a través de la monocapa modificada amb gramicidina es descriu amb una permeabilitat constant  $P_\infty$ . Això és completament consistent amb troballes prèvies, e.g. (7), que l'entrada del io  $Tl^+$  dins del canal de gramicidina és el pas que controla la velocitat de seva reducció, segons el model de Guidelli (10), que identifica aquest pas amb la deshidratació parcial del ió en la boca del porus.

La combinació de  $P(t)$  corresponent al model EDP, equació (11.17), amb l'equació integral genèrica (11.6), porta a

$$\left( P_\infty + P_\Delta \cdot e^{-k_\Sigma \cdot t} \right) \cdot \left[ nFAc_M^* - \frac{1}{\sqrt{\pi \cdot D_M}} \int_0^t \frac{I(\tau) d\tau}{\sqrt{t - \tau}} \right] = I(t) \quad (11.18)$$

La resolució numèrica de l'equació integral (11.18), ens permet obtenir el corrent en qualsevol instant, un cop es disposi de valors pels paràmetres  $P_\infty, P_\Delta$  i  $k_\Sigma$  del model EDP. Aquest procés es realitza amb un programa numèric, escrit en llenguatge Fortran, que utilitza una discretització de la integral en intervals petits en els que la variable incògnita es linealitza (mètode de Huber (27)).

El programa s'ha validat comparant els resultats en una situació que té solució analítica. Quan  $P_\Delta = 0$ ,  $P(t) = P_\infty$  (vegeu l'equació (11.16)). Físicament, això significa que no hi ha canvi en els setis conductors. La dependència del corrent amb el temps és ben coneguda (28):

$$I(t) = nFAc_M^* \cdot P_\infty \cdot \exp\left(\frac{P_\infty^2}{D_M} t\right) \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{P_\infty}{\sqrt{D_M}} \sqrt{t}\right) \quad (11.19)$$

La figura 11.5 mostra la bona concordança entre el corrent calculat analíticament i l'obtingut amb el programa.

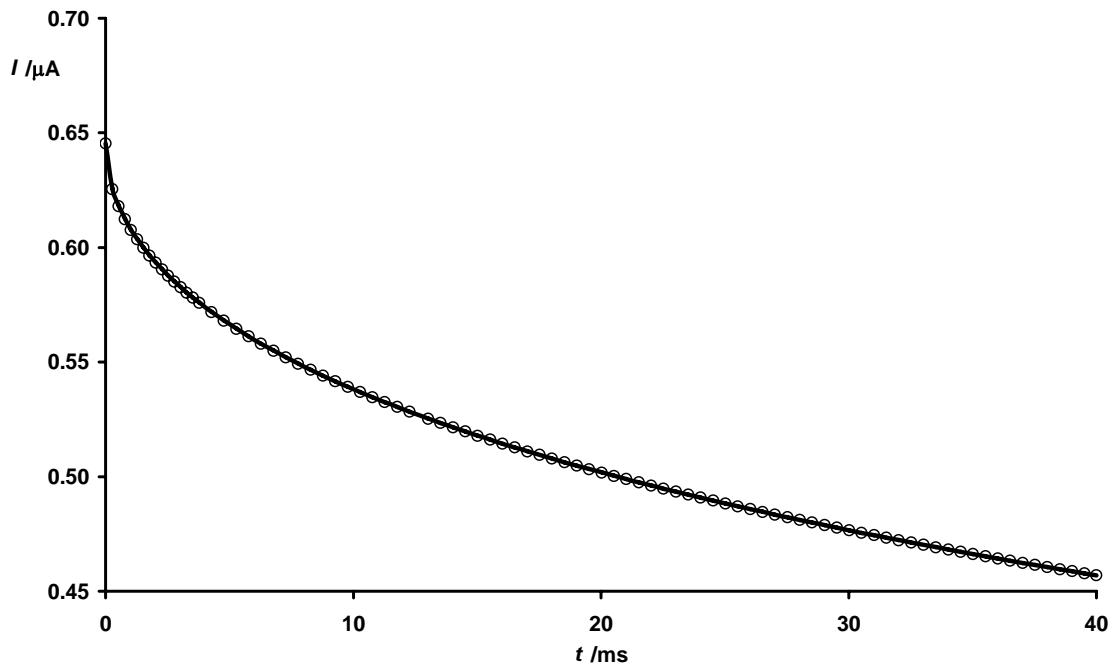


FIGURA 11.5: Comparació dels gràfics del corrent obtingut amb el programa de simulació (línea contínua) resolent l'equació (11.18) i amb la solució analítica (equació (11.19)) (marcador cercle buit) en front el temps quan  $P_{\Delta}=0$ . Els paràmetres són:  $P_{\infty} = 7.6 \cdot 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ;  $k_{\Sigma} = 1080 \text{ s}^{-1}$ ;  $D_M = 1.00 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ;  $n \cdot F \cdot A \cdot c_M^* = 8.49 \cdot 10^{-3} \text{ C m}^{-1}$

L'equació (11.19) suggereix l'elecció de

$$I(t) = nFAc_M^* \cdot P(t) \cdot \exp\left(\frac{P(t)^2}{D_M} t\right) \cdot \operatorname{erfc}\left(\frac{P(t)}{\sqrt{D_M}} \sqrt{t}\right) \quad (11.20)$$

com a candidat a solució del model EDP (i.e. la solució de l'equació (11.18)). Es pot comprovar que l'equació (11.20) no és la solució rigorosa d'aquest problema, però assajos numèrics han demostrat que es pot aplicar en exàmens preliminars de les dades amb bona precisió. Per exemple, les discrepàncies entre els marcadors  $\times$  en la figura 11.3 i els cercles només són significatives a temps molt curts. No obstant, l'aproximació és menys precisa per valors grans de  $P_{\Delta}$  (vegeu marcadors de la figura 11.6).

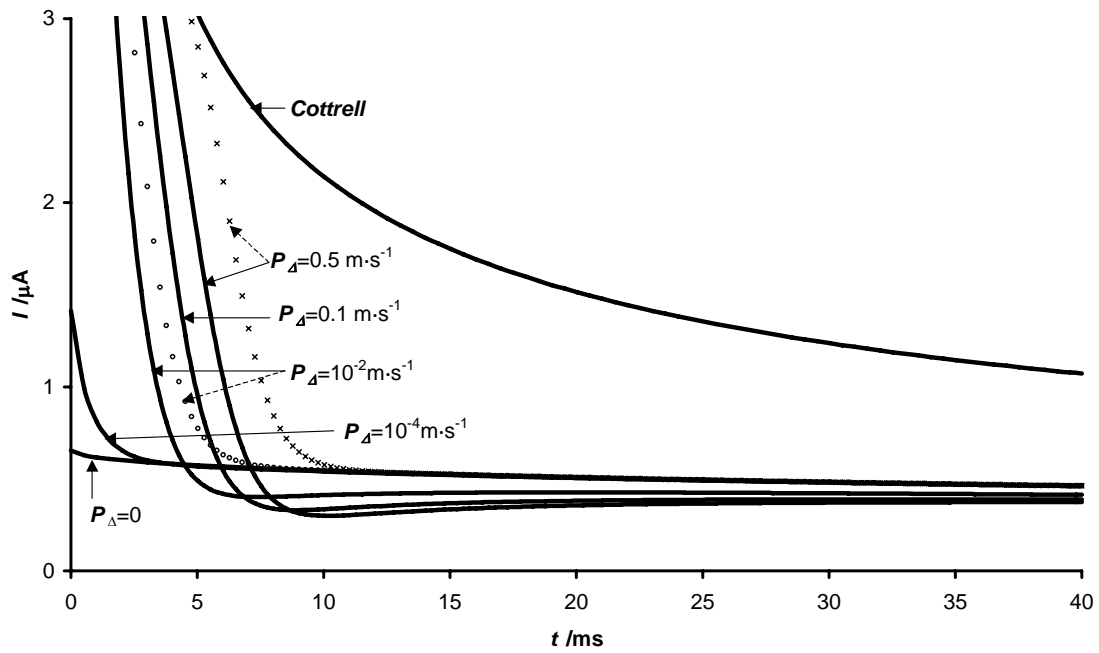


FIGURA 11.6 : Gràfics del corrent per diversos valors de  $P_{\Delta}$ . El gràfic amb  $P_{\Delta}=0$  correspon al cas amb solució analítica (equació (11.19)) i la línia retolada “Cottrell” correspon al corrent controlat per difusió. Els marcadors es refereixen a l’aproximació donada per l’equació (11.20) (  $\times$  per  $P_{\Delta}=0.5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$  i  $\circ$  per  $P_{\Delta}=10^{-2} \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$ ). Els altres paràmetres com en la figura 11.3 .

### 11.3.2.2 Impacte dels paràmetres en el model EDP

Amb el programa per calcular els corrents, es pot determinar l’impacte que els diferents paràmetres implicats tenen en una dependència temporal de  $P(t)$  que s’hagi escollit. El corrent en el model EDP (trobat a partir de (11.18)) depèn dels paràmetres rellevants següents:  $D_M, P_{\infty}, P_{\Delta}, k_{\Sigma}, c_M^*$  i  $t$ . Discutim ara l’efecte de cada un d’ells.

#### a) Efecte de $P_{\infty}$ i $P_{\Delta}$

Conèixer l’impacte que tenen  $P_{\infty}$  i  $P_{\Delta}$  sobre els corrents pot subministrar valuosa informació teòrica que pot ajudar a a validar o descartar un model. L’efecte de  $P_{\infty}$  es mostra en la figura 11.7 . Com més gran és  $P_{\infty}$ , més gran és el corrent. Tanmateix, les

diferències entre les corbes disminueixen amb el temps degut a la tendència comuna de totes les corbes de tendir a 0.

La figura 11.6 mostra l'evolució del corrent per sistemes en els que s'ha variat  $P_{\Delta}$ . Valors més grans de  $P_{\Delta}$  produeixen corbes més pendents a temps curts. La corba amb menys pendent correspon al valor  $P_{\Delta}=0$ . Com s'aprecia a la figura 11.6, les corbes amb  $P_{\Delta}$  més grans donen corrents més grans a temps més curts, i corrents més petits a temps més llargs. Això es pot considerar degut a un flux iònic molt gran travessant els canals en els instants inicials per valors grans de  $P_{\Delta}$ , donant lloc a una disminució de  $M$  prop de la capa fosfolipídica i generant gradients menys pronunciats de  $M$  en els instants posteriors.

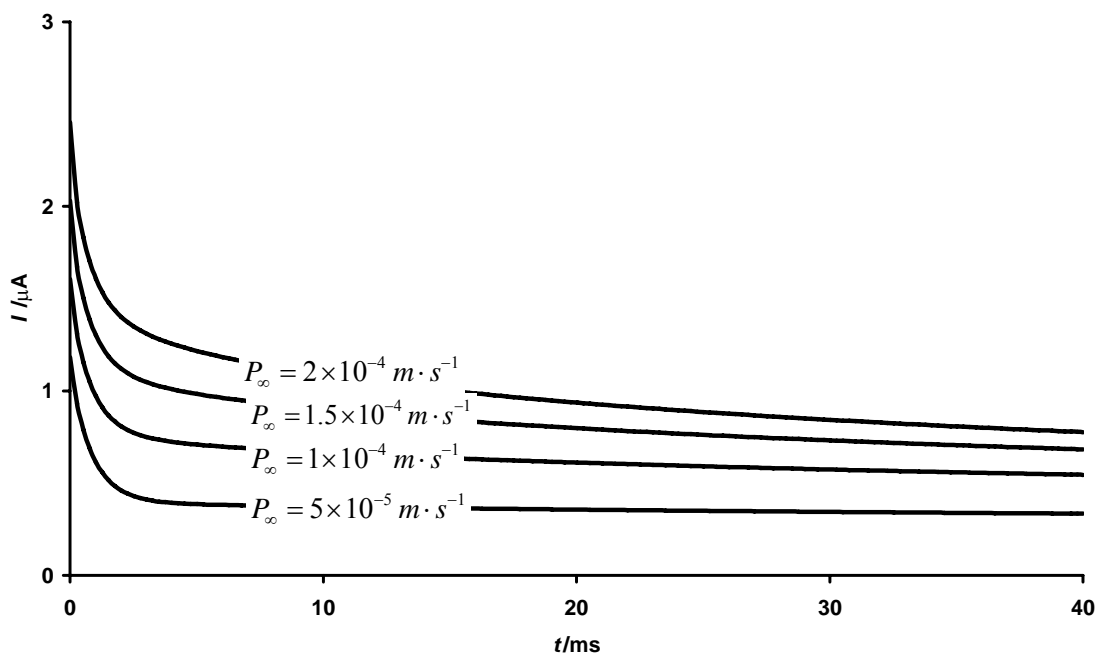


FIGURA 11.7 : Impacte del canvi de  $P_{\infty}$  en l'evolució del corrent. Els paràmetres restants com en la figura 11.3

S'observa en la figura 11.6 que tots els corrents són menors que el corresponent al cas limitat per difusió (corrent de Cottrell) i que per valors grans de  $P_{\Delta}$  el corrent passa per



un mínim. El mínim de  $I(t)$  vs.  $t$  es pot entendre de la següent manera. Si  $P_{\Delta}$  és gran, a  $t$  curt, la permeabilitat és alta donant lloc a corrents grans i a una disminució notable de  $M$  prop de la capa de lípid. A un temps intermedi (e.g. al voltant de 10 mil·lsegons), la disminució de  $c_M(0,t)$  encara és significativa (la difusió és lenta per restaurar el material reduït) mentre la permeabilitat assoleix una mena de valor estable i s'arriba al mínim en  $I(t)$ . El corrent es recupera perquè la permeabilitat es manté constant i té lloc una certa reposició deguda a la difusió des de la solució. Finalment, a temps més llargs el corrent passa per un màxim relatiu abans d'arribar (a  $t$  infinit) el valor d'estat estacionari que val zero.

**b) Efecte de  $k_+$  i  $k_-$ .**

Com es pot veure en la figura 11.8, un increment en  $k_+$ , sense canvi en  $k_-$ , porta a un increment en el corrent, com és d'esperar d'una proporció més gran de canals iònics actius en la monocapa lipídica, i, naturalment, un augment de  $P_{\infty}$  (el valor limitant a temps infinit). Però pels valors de  $k_+$  que donen  $P_{\Delta}$  negatius (és a dir, que la proporció de canals actius és més gran a temps infinit que al començament) s'observa un màxim en la gràfica del corrent en front del temps. Aquest màxim pot ser interpretat com un canvi en la predomini d'una permeabilitat creixent a una disponibilitat decreixent de  $M$  en la proximitat de la monocapa.

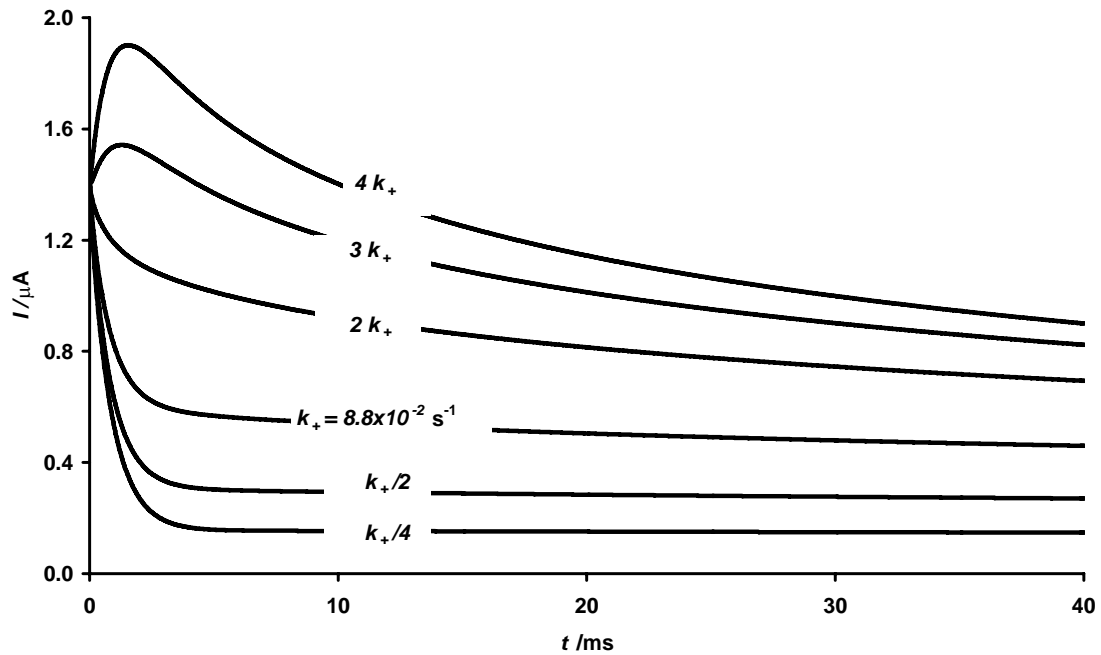


FIGURA 11.8 : Gràfics dels corrents per a diferents valors de  $k_+$ . La resta de paràmetres com en la figura 11.3.

Altres càlculs, que aquí no es mostren, indiquen que el corrent i  $P(t)$  disminueixen quan  $k_+$  augmenta.

Com que la relació  $k_+ / k_-$  és la constant d'equilibri de l'interconversió de l'esquema (11.7),  $P_\infty$  s'hauria de mantenir constant quan  $k_+$  i  $k_-$  s'incrementin pel mateix factor, però el valor més gran de  $k_\Sigma = k_+ + k_-$  hauria de conduir a una aproximació més ràpida de la permeabilitat a  $P_\infty$  i els corrents convergrien més aviat cap els valors previstos per l'equació (11.19). Els corrents són molt sensibles als paràmetres  $k_+$  i  $k_-$  a temps curt, però les diferències decreixen per  $t$  més grans quan els canvis en la relació  $k_+ / k_-$  són menys importants (vegeu la figura 11.8).

## 11.4 Anàlisi dels resultats experimentals

### 11.4.1 Validació del model EDP

#### 11.4.1.1 Linealitat amb la concentració “bulk” de $Tl^+$

L'equació principal en el model EDP, (11.18), prescriu una relació lineal entre el corrent i la concentració del “bulk” ja que el model d'interconversió pel procés ii

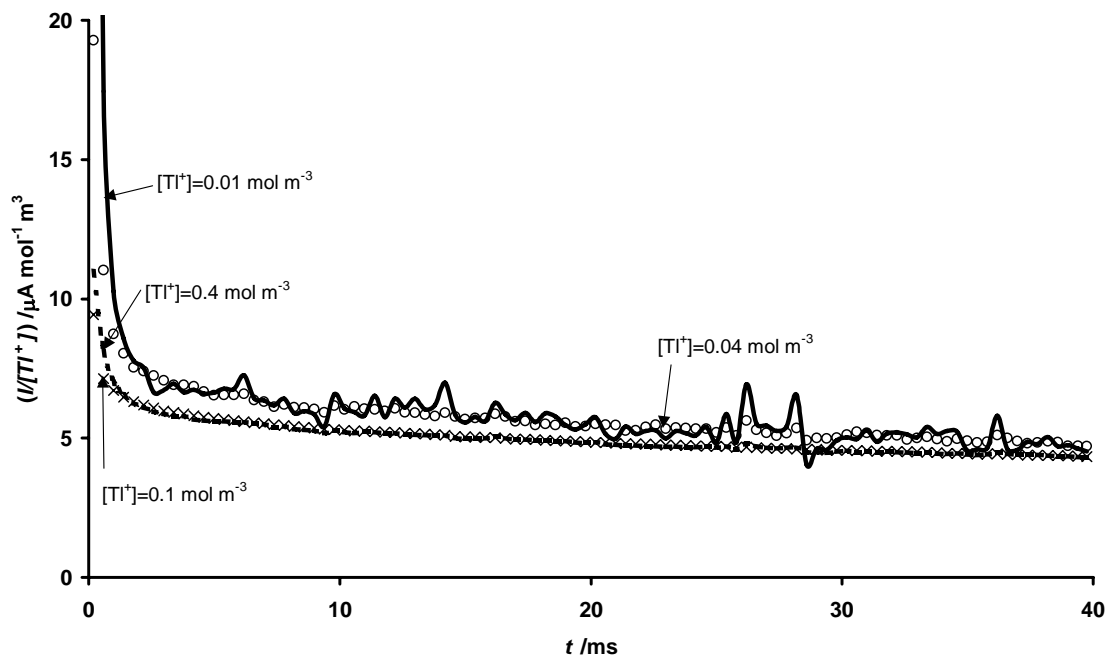


FIGURA 11.9 : Gràfics del quocient del corrent mesurat per la concentració de  $Tl^+$  en front del temps. Els marcadors corresponen a diferents concentracions “bulk” de Tal·li (I):  $10^{-5} M$  (línia contínua),  $4 \times 10^{-5} M$  (cercles),  $10^{-4} M$  (x) i  $4 \times 10^{-4} M$  (puntejada). Tots els corrents s'han determinat a un potencial de  $-0.5$  volts. Cada punt en el gràfic correspon al promig de 16 punts experimentals al llarg de  $0.4 ms$  entorn al valor del temps representat.

assumeix que els paràmetres  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$  i  $k_\Sigma$  són independents de  $c_M^*$  d'acord amb les equacions (11.10), (11.15) i (11.16). Per comprovar aquesta propietat de linearitat hem representat en la figura 11.9 la relació entre els corrents mesurats (dels que s'han restat els blancs corresponents) i la concentració de metall en el “bulk” en front del temps, per quatre valors diferents de  $c_M^*$ . Tenint en compte la incertesa estimada, la concordança és força satisfactòria, encara que a temps molt curts ( $t < 1 ms$ ) hi ha una certa desviació de la superposició esperada de les corbes. La linearitat dels corrents a temps grans amb  $c_M^*$  és compatible amb les dades representades en la figura 11.10, on

s'ha representat la mitjana dels corrents entre 10 i 40 ms en front de la concentració “bulk” de  $Tl^+$  ( $r^2$  de l'ajust lineal és 0.9991). Encara que el model EDP no queda confirmat completament pels experiments de corrent – ja que no se satisfà completament una relació lineal, especialment per temps curts o per concentracions “bulk” grans-, es pot presentar com una bona primera aproximació.

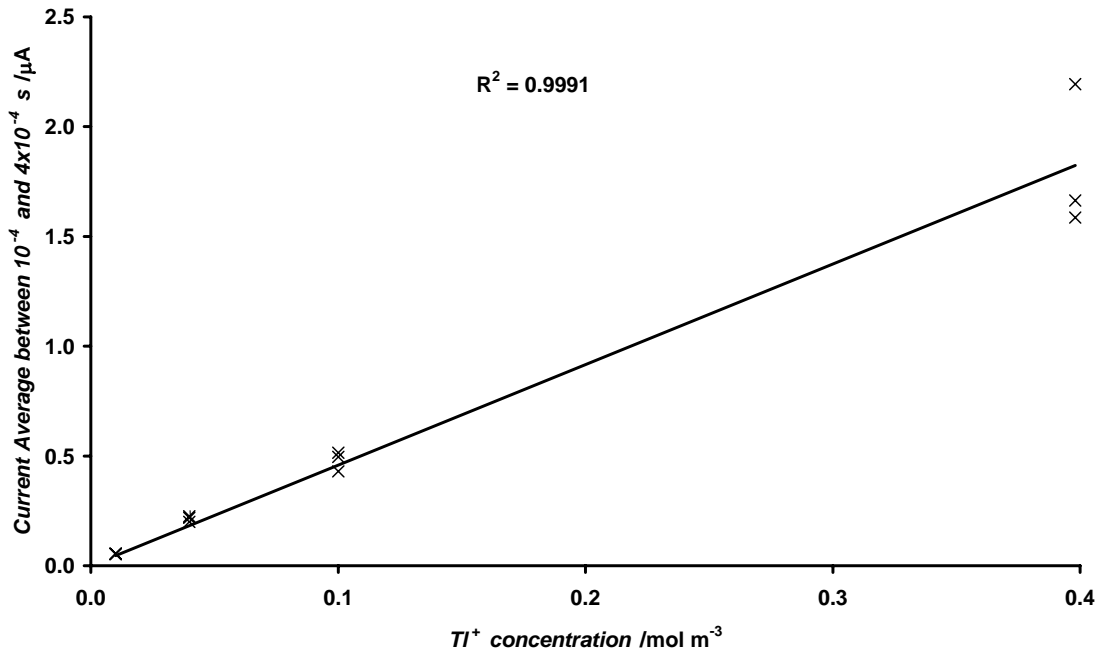


FIGURA 11.10 : Dependència lineal del corrent amb la concentració “bulk” del Tal·li per sèries enregistrades a  $-0.5$  V. Cada punt correspon al promig (entre 10 i 40 ms) dels corrents mesurats al llarg d'una repetició.

Refinaments posteriors en els processos ii i iii que donin millors ajustos de les dades (usant la metodologia suggerida de càlcul de la permeabilitat) impliquen un nombre més gran de paràmetres que els del senzill model EDP que aquí hem desenvolupat. En el capítol següent es veuran refinaments al model.

#### 11.4.1.2 Bondat de l'ajust

S'ha procedit a la “semi integració” d'un conjunt de corrents experimentals obtinguts del sistema fosfolípid-gramicidina (vegeu la línia fluctuant lleugerament en la figura

11.3) per obtenir  $P(t)$ , que hem dibuixat com una línia contínua en la figura 11.4. L'ajust d'aquesta  $P(t)$  al model EDP proposat (equació (11.17)) dona els paràmetres  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$  i  $k_\Sigma$ . Els paràmetres resultants del millor ajust d'aquestes dades particulars usant un algorisme de regressió no lineal(29) són:  $P_\infty = 7.71 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ;  $P_\Delta = 8.92 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$  i  $k_\Sigma = 1141 \text{ s}^{-1}$ . La permeabilitat esperada a partir d'aquests valors s'ha dibuixat com a cercles buits en la figura 11.4 en la que la concordança amb la  $P(t)$  obtinguda via semi-integració és bona. La permeabilitat teòrica assoleix un valor pràcticament constant una mica abans que la permeabilitat experimental. Posteriorment, es veu que el corrent obtingut (vegeu els cercles en la figura 11.3) reproduïx raonablement bé el corrent experimental.

#### 11.4.2 Paràmetres obtinguts

Seguint el procediment descrit en l'apartat 4.1 d'aquest capítol, s'han analitzat els corrents obtinguts a 3 potencials diferents i a 4 concentracions diferents de Tal·li al si de la dissolució. Per cada combinació de potencial i concentració, hem usat tres repeticions per poder estimar la incertesa de l'ajust dels paràmetres. Els valors de  $P_\infty$  obtinguts en l'ajust es mostren en la taula 11.1, els de  $P_\Delta$  en la taula 11.2 i els de  $k_\Sigma$  en la taula 11.3. En aquestes taules podem destacar dues coses:

i) els paràmetres  $P_\Delta$  i  $k_\Sigma$  -físicament relacionats amb els mil·lisegons inicials de l'experiment- són menys independents de la concentració de Tl en el "bulk" (els valors de  $P_\Delta$  i  $k_\Sigma$  obtinguts en les taules 11.2 i 11.3 mostren una certa tendència a disminuir quan augmenta  $c_M^*$ ). Els valors estimats de  $P_\Delta$  (taula 2) mostren especialment una gran dispersió, com era d'esperar del fet que aquest paràmetre és molt sensible als valors dels corrents a temps curts. Especialment divergents són els valors de  $P_\Delta$  pel valor més petit de concentració, fet que pot ser atribuït a la importància relativa de les fluctuacions dels corrents a baixes concentracions comparat amb el valor baix de corrent mesurat (vegeu

mesurat (vegeu la línia oscil·lant en la figura 11.9). Aquesta variabilitat de  $P_{\Delta}$  i  $k_{\Sigma}$  amb la concentració de l'espècie permeant en el "bulk" pot ser deguda tant a la manca de precisió en les mesures dels corrents a temps extremadament baixos o a una lleugera desviació del model EDP suggerit (vegeu la manca de linealitat dels corrents a temps curts en la figura 11.9). Tanmateix, la desviació no sembla suficientment prominent per descartar el model EDP de les dades dels corrents, com una simple primera aproximació. En el capítol següent es descriu un refinament en els models del procés ii (interconversió) i del procés iii (pas pel canal) que permeten un millor ajust de les dades, però que fan necessari l'ús de més de tres paràmetres.

$P_{\infty} / \text{m s}^{-1}$	$E$		
	$-0.5 \text{ V}$	$-0.6 \text{ V}$	$-0.7 \text{ V}$
$[\text{TI}^+] = 10^{-5} \text{ M}$	$9.37 \times 10^{-5} \pm 1.79 \times 10^{-5}$	$8.40 \times 10^{-5} \pm 5.3 \times 10^{-6}$	$9.01 \times 10^{-5} \pm 2.5 \times 10^{-6}$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$	$9.13 \times 10^{-5} \pm 4.2 \times 10^{-6}$	$8.79 \times 10^{-5} \pm 4.2 \times 10^{-6}$	$8.81 \times 10^{-5} \pm 5.6 \times 10^{-6}$
$[\text{TI}^+] = 10^{-4} \text{ M}$	$9.01 \times 10^{-5} \pm 9.7 \times 10^{-6}$	$8.16 \times 10^{-5} \pm 8.9 \times 10^{-6}$	$7.44 \times 10^{-5} \pm 7.5 \times 10^{-6}$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$6.89 \times 10^{-5} \pm 2.6 \times 10^{-6}$	$6.55 \times 10^{-5} \pm 3.2 \times 10^{-6}$	$6.03 \times 10^{-5} \pm 1.5 \times 10^{-6*}$

Taula 11.1: Valors de  $P_{\infty}$  obtinguts ajustant la permeabilitat  $P(t)$  (obtinguda de la semi integració dels corrents) amb l'equació (11.17) per 3 polsos diferents de potencial i 4 concentracions diferents de  $\text{TI}^+$ . Es van considerar tres repeticions (excepte quan es diu un altra cosa) de cada experiment per obtenir el rang de variabilitat de cada paràmetre. Els paràmetres fixes:  $D_M = 2.00 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \text{ s}^{-1}$ ,  $n=1$  i  $A = 8.825 \times 10^{-7} \text{ m}^2$ .

\* Només es va disposar de dues repeticions.

$P_{\Delta} / \text{m s}^{-1}$	$E$		
	$-0.5 \text{ V}$	$-0.6 \text{ V}$	$-0.7 \text{ V}$
$[\text{TI}^+] = 10^{-5} \text{ M}$	$7.69 \times 10^{-4} \pm 1.78 \times 10^{-4}$	$8.67 \times 10^{-4} \pm 2.07 \times 10^{-4}$	$1.17 \times 10^{-3} \pm 1.4 \times 10^{-4}$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.74 \times 10^{-4} \pm 5.0 \times 10^{-5}$	$2.29 \times 10^{-4} \pm 6.9 \times 10^{-5}$	$2.34 \times 10^{-4} \pm 4.7 \times 10^{-5}$
$[\text{TI}^+] = 10^{-4} \text{ M}$	$1.10 \times 10^{-4} \pm 1.6 \times 10^{-5}$	$1.31 \times 10^{-4} \pm 2.5 \times 10^{-5}$	$7.54 \times 10^{-5} \pm 2.53 \times 10^{-5}$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$7.91 \times 10^{-5} \pm 6.0 \times 10^{-6}$	$6.04 \times 10^{-5} \pm 3.1 \times 10^{-6}$	$5.95 \times 10^{-5} \pm 3.26 \times 10^{-5*}$

 Taula 11.2: Valors de  $P_{\Delta}$  obtinguts en el procés explicat en el peu de la taula 11.1

\* Només es va disposar de dues repeticions.

$k_{\Sigma} / \text{s}^{-1}$	$E$		
	$-0.5 \text{ V}$	$-0.6 \text{ V}$	$-0.7 \text{ V}$
$[\text{TI}^+] = 10^{-5} \text{ M}$	$2.28 \times 10^3 \pm 7 \times 10^1$	$2.32 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^2$	$2.70 \times 10^3 \pm 4 \times 10^1$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-5} \text{ M}$	$1.63 \times 10^3 \pm 3.2 \times 10^2$	$1.93 \times 10^3 \pm 2.7 \times 10^2$	$2.05 \times 10^3 \pm 1.5 \times 10^2$
$[\text{TI}^+] = 10^{-4} \text{ M}$	$1.23 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^2$	$1.52 \times 10^3 \pm 1.6 \times 10^2$	$1.42 \times 10^3 \pm 7 \times 10^1$
$[\text{TI}^+] = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$	$9.64 \times 10^2 \pm 2.15 \times 10^2$	$8.75 \times 10^2 \pm 2.39 \times 10^2$	$1.56 \times 10^3 \pm 1.09 \times 10^{3*}$

 Taula 11.3: valors de  $k_{\Sigma}$  obtinguts en el procés explicat en el peu de la taula 11.1.

\* Només es va disposar de dues repeticions.

En contrast amb la variabilitat dels valors de  $P_{\Delta}$  i  $k_{\Sigma}$ ,  $P_{\infty}$  és essencialment independent de  $c_M^*$  i es pot considerar com el més robust dels paràmetres recuperats.

ii) Tenint en compte les incerteses, l'efecte del potencial final assajat no sembla ser significatiu per cap paràmetre. Això es pot interpretar físicament com que la interconversió no depèn del potencial (en aquesta regió de la reducció del  $Tl^+$ ), ja que s'ha sobrepassat (30) un determinat llindar(31).

## 11.5 Conclusions

En una solució que conté un ió metàl·lic permeant electroactiu, el corrent en un elèctrode recobert amb una monocapa lipídica modificada amb canals, es pot modelar com un procés simple de difusió des del si de la solució, seguit d'un transport a través un sèrie de canals incorporats a la monocapa. Un principi fonamental d'aquesta aproximació és la ben coneguda relació (11.2) que existeix entre la concentració del ió permeant i el gradient en la superfície monocapa-solució (independentment de la natura del procés interfacial que opera). Usant el concepte de permeabilitat local ( $P(t)$ , equació (11.5)), obtenim l'equació general (11.6) que relaciona els corrent mesurat amb la permeabilitat local (suposem que no hi ha acumulació del permeant). El tractament pot ser usat tant per predir el corrent a partir d'una expressió donada de  $P(t)$  o, a la inversa, per determinar  $P(t)$  del corrent usant una tècnica de semi integració. Les dades experimentals de la reducció del  $Tl^+$  en un elèctrode recobert d'una monocapa modificada amb gramicidina mostra un decaïment exponencial de  $P(t)$ . Aquest comportament de  $P(t)$  suporta un model específic per la permeabilitat (Permeabilitat Decaïent Exponencialment: "Exponentially Decaying Permeability" –EDP–) en el que la conducció és controlada per la interconversió de les formes conductora i no conductora de la gramicidina, seguida d'un procés cinètic heterogeni de primer ordre.



La raonable linealitat del corrent experimental (en particular per temps no massa curts) amb la concentració del  $Tl^+$  dóna suport a la validesa del model EDP com una bona primera aproximació. L'expressió resultant per la permeabilitat (equació (11.17)) inclou 3 paràmetres:  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$  i  $k_\Sigma$ , essent  $P_\infty$  el més robust dels tres.

En resum, l'expressió general (11.6) és aplicable a qualsevol sistema de transport iònic a través d'una sèrie de canals conformacionalment làbils en una monocapa impermeable, on les condicions de difusió estan ben definides, ja que això permet la identificació sense ambigüitat de la permeabilitat del sistema. La combinació específica d'un model de primer ordre per la interconversió dels canals conductors i un model cinètic heterogeni de primer ordre pel pas dels canals, porta a la permeabilitat donada per l'equació (11.17) i coincideix raonablement amb les dades experimentals.

## 11.6 Referències

1. Hodgkin, A. L.; Huxley, A. F. Currents carried by sodium and potassium ions through the membrane of the giant axon of *Loligo*. *J.Physiol.* **1952**, *116*, 449-472.
2. Colquhoun, D.; Hawkes, A. G. On the stochastic properties of single ion channels. *Proc.R.Soc.Lond.Ser.B* **1981**, *211*, 205-235.
3. Jordan, P. C. Electrostatic modeling of ion pores - energy barriers and electric-field profiles. *Biophys.J.* **1982**, *39*, 157-164.
4. Ritchie, R. J.; Larkum, A. W. D. Uptake of thallium, a toxic heavy-metal, in the cyanobacterium *Synechococcus* R-2 (*Anacystis nidulans*, S-leopoliensis) PCC 7942. *Plant and Cell Physiology* **1998**, *39*, 1156-1168.
5. Nelson, A. Electrochemical studies of thallium(I) transport across gramicidin modified electrode-adsorbed phospholipid monolayers. *J.Electroanal.Chem.* **1991**, *303*, 221-236.
6. Nelson, A. Conducting gramicidin channel activity in phospholipid monolayers. *Biophys.J.* **2001**, *80*, 2694-2703.

7. Nelson, A. Influence of biologically active compounds on the monomolecular gramicidin channel function in phospholipid monolayers. *Langmuir* **1996**, *12*, 2058-2067.
8. Nelson, A.; Bizzotto, D. Chronoamperometric study of Tl(I) reduction at gramicidin- modified phospholipid-coated mercury electrodes. *Langmuir* **1999**, *15*, 7031-7039.
9. Stryer, L. *Biochemistry*, 3rd ed.; W. H. Freeman: New York, 1988.
10. Becucci, L.; Moncelli, M. R.; Guidelli, R. Thallous ion movements through gramicidin channels incorporated in lipid monolayers supported by mercury. *Biophys.J.* **2002**, *82*, 852-864.
11. Oldham, K. B. Convolution - A General Electrochemical Procedure Implemented by a Universal Algorithm. *Anal.Chem.* **1986**, *58*, 2296-2300.
12. Oldham, K. B. Interrelation of Current and Concentration at Electrodes. *J.Appl.Electrochem.* **1991**, *21*, 1068-1072.
13. Oldham, K. B.; Myland, J. C. In *Fundamentals of Electrochemical Science*; Academic Press: San Diego, 1994; pp 219-262.
14. Mahon, P. J.; Oldham, K. B. Incorporating electrode kinetics into the convolutive modeling of reactions at planar, cylindrical and spherical electrodes. *Electrochim.Acta.* **2001**, *46*, 953-965.
15. Hepel, M. Ion channeling phenomena and Tl-upd induced film dynamics in model biomembranes studied with EQCN and QCI techniques. *J.Electroanal.Chem.* **2001**, *509*, 90-106.
16. Ulrich, W. P.; Vogel, H. Polarization-modulated FTIR spectroscopy of lipid/gramicidin monolayers at the water interface. *Biophys.J.* **1999**, *76*, 1639-1647.
17. Killian, J. A. Gramicidin and gramicidin lipid interactions. *Biochim.Biophys.Acta* **1992**, *1113*, 391-425.
18. Naydenova, S.; Petrov, A. G.; Yarwood, J. An ftir-atr study of the incorporation of the peptide gramicidin-d into dppa self-assembled multilayers. *Langmuir* **1995**, *11*, 3435-3437.
19. Ogoshi, S.; Mita, T. Conformation of gramicidin in monolayers, organic solvents and phospholipid bilayers. *Bull.Chem.Soc.Jpn.* **1997**, *70*, 841-846.
20. Dhathathreyan, A.; Baumann, U.; Muller, A.; Mobius, D. Characterization of complex gramicidin monolayers by light- reflection and fourier-transform infrared-spectroscopy. *Biochim.Biophys.Acta* **1988**, *944*, 265-272.
21. Biron, E.; Voyer, N.; Meillon, J. C.; Cormier, M. E.; Auger, M. Conformational and orientation studies of artificial ion channels incorporated into lipid bilayers. *Biopolymers* **2000**, *55*, 364-372.

22. Hollerbach, U.; Eisenberg, R. S. Concentration-dependent shielding of electrostatic Potentials inside the gramicidin A channels. *Langmuir* **2002**, *18*, 3626-3631.
23. Nelson, A. Effect of lipid charge and solution composition on the permeability of phospholipid gramicidin monolayers to  $Tl^+$ . *J.Chem.Soc.Faraday Trans.* **1993**, *89*, 2799-2805.
24. Nelson, A. Influence of fixed charge and polyunsaturated compounds on the monomolecular gramicidin channel function in phospholipid monolayers: Further studies. *Langmuir* **1997**, *13*, 5644-5651.
25. Mauzeroll, J.; Buda, M.; Bard, A. J.; Prieto, F.; Rueda, M. Detection of Tl(I) transport through a gramicidin- dioleoylphosphatidylcholine monolayer using the substrate generation-tip collection mode of scanning electrochemical microscopy. *Langmuir* **2002**, *18*, 9453-9461.
26. Rueda, M.; Navarro, I.; Ramirez, G.; Prieto, F.; Prado, C.; Nelson, A. Electrochemical impedance study of  $Tl^+$  reduction through gramicidin channels in self-assembled gramicidin-modified dioleoylphosphatidylcholine monolayers on mercury electrodes. *Langmuir* **1999**, *15*, 3672-3678.
27. Feldberg, S. W. In ; Bard, A. J., Ed.; Marcel Dekker: New York, 1969; pp 199-296.
28. Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Wiley: New York, 1980.
29. Wolfram, S. *Mathematica. A System for Doing Mathematics by Computer*, Addison-Wesley Publishing Company: Redwood City (California), 1988.
30. Andersen, O. S. Ion movement through gramicidin-a channels - interfacial polarization effects on single-channel current measurements. *Biophys.J.* **1983**, *41*, 135-146.
31. Kurnikova, M. G.; Coalson, R. D.; Graf, P.; Nitzan, A. A lattice relaxation algorithm for 3D Poisson-Nernst-Planck theory with application to ion transport through the Gramicidin A channel. *Biophys.J.* **1999**, *76*, A211-A211.



# Capítol 12

Interpretació dels fluxos iònics  
a través de canals en monocapes

Part d'aquest capítol ha estat publicat a

**Langmuir** 23(2007) 10581-10588

---

## **12. Interpretació dels fluxos iònics en conjunts de canals en monocapes**

### **12.1 Introducció**

Les capes simples de fosfolípids sobre elèctrodes de mercuri són dispositius electroquímics clàssics per modelar determinats processos que es donen sobre membranes biològiques(1)(2-5). Malgrat que només s'utilitzen monocapes, en compte de les bicapes que formen l'entramat de les membranes biològiques, la gran simplicitat i manejabilitat del model el fan un instrument perfecte per comprendre els principis fonamentals de l'estructura i les funcions de les membranes biològiques. Aquest sistema també s'ha demostrat particularment útil per estudiar els mecanismes físico químics fonamentals de la funció dels canals iònics incorporats com a molècules de gramicidina en la monocapa (5-9).

Des dels treballs pioners de Nelson, molts altres autors (10-13) han desenvolupat sistemes de membranes sobre elèctrodes que incorporen canals iònics de complexitat creixent. L'ús, però, de sondes electroactives permeants per caracteritzar aquests sistemes de canals no s'ha usat amb extensió malgrat la seva sensibilitat. Això és degut principalment a la manca d'un model per analitzar les dades. Existeix, per tant, la necessitat d'una anàlisi genèrica que permeti relacionar els corrents observats en aquestes disposicions de canals amb la seva funció.

En el capítol anterior(14), s'han analitzat els corrents i la permeació quan s'aplicaven polsos de potencial (en condicions limitades per difusió) a un sistema en el que la monocapa fosfolipídica contenia canals monomoleculars de gramicidina. L'ús de additius en sistemes com aquest és un procediment experimental típic per entendre

---

l'efecte de fàrmacs, drogues, anestèsics o altres compostos bioactius sobre les propietats de les membranes biològiques. És ben conegut que els compostos bioactius hidrofòbics influeixen en l'activitat de la gramicidina en les membranes de fosfolípids a causa de la seva interacció amb el pèptid i/o l'estructura de la monocapa, afectant l'estabilitat i les característiques del transport iònic de la gramicidina i modificant la permeabilitat de la membrana(15).

En el present capítol estenem, d'una forma més quantitativa, el treball desenvolupat en el capítol anterior (6) considerant l'impacte dels additius *all trans* retinol i benzo- $\alpha$ -pirè (sistemes policonjugats) en la permeabilitat al  $Tl^+$  de les monocapes lipídiques modificades amb gramicidina. S'ha considerat el retinol per la seva important i significativa funció biològica i la seva presència en les membranes biològiques(16), mentre que el benzo- $\alpha$ -pirè s'ha usat per observar els efectes d'un potencial contaminant (17) de la funció dels canals iònics i, així, el sistema podria ser usat en posteriors aplicacions com a sensor si s'obté resposta. Mecanísticament, l'efecte de tant el retinol com el benzo- $\alpha$ -pirè, poden resultar d'interès, ja que el retinol és un sistema policonjugat i el benzo- $\alpha$ -pirè és poliaromàtic. Per tant, aquestes molècules tenen la possibilitat d'interactuar amb les restes aromàtiques del triptòfan de la gramicidina i afectar la seva estructura i la seva funció com a canal iònic.

També hem refinat el model EDP (14) (Exponentially Decaying Permeability) descrit en el capítol anterior, per millorar l'ajust del corrent i la permeabilitat a diferents potencials amb els valors experimentals obtinguts quan s'han usat aquests additius. El refinament aporta un factor important. Prèviament, l'aplicació del EDP estava restringida als potencials que defineixen la regió del corrent límit en la reducció del  $Tl^+$ . Això era una mica restrictiu, ja que la permeabilitat de la monocapa modificada amb

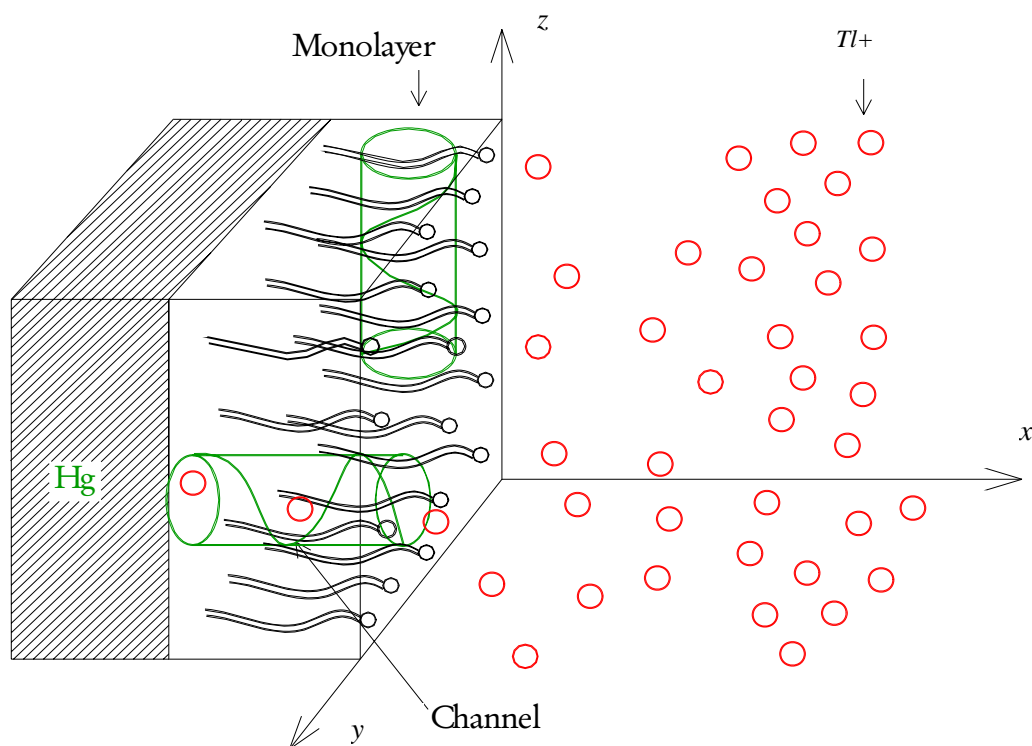


gramicidina a potencials més negatius aproximant-se al punt de càrrega zero (PZC) del mercuri també és interessant. Descriu com es fa aquest procés introduint un tractament addicional que inclou el comportament redox de  $Tl^+/Tl(Hg)$  i permet l'estimació dels paràmetres que caracteritzen la permeabilitat de la monocapa des de potencials aproximadament  $-0.375$  V vs Ag/AgCl. Aquest tractament introdueix un paràmetre extra  $k_2$  el qual caracteritza el transport del  $Tl^+$  des del porus de la gramicidina cap a la solució. Encara que el model ha sigut validat amb dades experimentals d'un arranjament relativament simple de canals en una monocapa fosfolipídica, pot ser usat per analitzar les dades obtingudes amb sistemes de canals més complexos.

## 12.2 Sistema experimental

El sistema que hem modelat consisteix en una monocapa del lípid dioleil fosfatidilcolina (DOPC) cobrint una gota de mercuri i amb canals iònics de gramicidina que actuen de medi permeant a través de la monocapa (vegeu la figura 12.1). Un ió metàl·lic ( $Tl^+$ ) en la solució es redueix en l'elèctrode de mercuri quan s'aplica un pols de potencial durant 40 ms, i mesurem el corrent obtingut com a funció resposta. Els experiments s'han dut a terme modificant l'esquema descrit en el capítol 4: els electròlits, la gota de mercuri i la gramicidina es preparaven tal com es descriu en l'apartat 4.3.4.1. Les solucions de treball de *all-trans* retinol i benzo- $\alpha$ -pirè (SIGMA Chemicals Ltd) es preparaven inicialment en acetona. Les monocapes de les barreges de DOPC (Semi-synthetic grade, Lipid Products, UK) amb *all-trans* retinol i amb benzo- $\alpha$ -pirè es preparaven com abans (18) barrejant el DOPC i la fracció molar necessària de l'additiu en pentà, i escampant la barreja en la interfície gas-aigua (area=28 cm<sup>2</sup>) de la cel·la electroquímica (volum=50 cm<sup>3</sup>). En el text ens referim a la composició de la monocapa amb la fracció molar de l'additiu. Les monocapes de la interfície gas-aigua

es modificaven amb gramicidina D (SIGMA Chemicals Ltd) afegint 3  $\mu\text{L}$  de gramicidina  $2.13 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$  en una solució stock en metanol de l'electròlit (19). Es deixava 10 minuts per permetre la incorporació de la gramicidina afegida a la monocapa de la interfície gas-aigua. La Gramicidina D és una barreja de gramicidines A, B i C en una proporció aproximada de 72:9:19 respectivament (20,21). Una nova gota de mercuri, de  $A = 0.0088 \text{ cm}^2$  d'àrea, s'immergia en la solució i quedava recoberta de la monocapa de la interfície gas-aigua abans de cada experiment. L'electròlit usat era KCl  $0.1 \text{ mol L}^{-1}$  preparat a partir de la sal pre-escalfada al forn (BDH Chemicals Ltd).



**Figura 12.1:** Esquema representant la difusió dels ions  $\text{Tl}^+$  (cercles vermells), la seva ocupació dels canals de gramicidina (cilindres verds) i l'arribada a l'electrode de mercuri. Els canals de gramicidina que no estan orientats correctament no poden contribuir al pas dels ions. La superfície de la capa de fosfolípids en contacte amb la solució correspon al pla  $x=0$  en un sistema real tridimensional. En el model,  $x$  és l'única coordenada espacial rellevant.

Com ja s'ha descrit en el capítol 4, els experiments consistien en una sèrie de polsos de potencials aplicats a la monocapa. Els polsos s'aplicaven des d'un potencial base de  $-0.2$

V fins a un voltatge cada cop més negatiu des de  $-0.3$  V fins a  $-0.7$  V, en intervals de  $0.025$  V. La durada de cada un d'ells era de  $0.04$  s. Entre polsos consecutius, l'elèctrode es portava a  $-0.2$  V durant al menys  $10$  s per eliminar el Tal·li reduït del mercuri. El corrent ( $I(t)$ ) s'enregistrava amb una freqüència de mostreig de  $40$  kHz amb un pre-filtre de pas baix de  $20$  kHz. Es van fer dos o tres rèpliques d'escombrats de potencials endavant i endarrere que es van etiquetar com a, b i c respectivament. Els valors promitjos dels corrents i dels paràmetres cinètics es van extreure dels escombrats de potencials creixents. El rang de resultats de les rèpliques dels experiments es mostren en forma de barres d'error en els gràfics corresponents. La concentració del ió electroactiu en aquesta sèrie d'experiments era  $10^{-4}$  M preparada a partir d'una dissolució de treball de  $\text{TINO}_3$  (SIGMA Chemicals Ltd). Els experiments amb *all-trans* retinol es van dur a terme sota una llum vermella poc intensa a causa de la sensibilitat a la llum d'aquest compost.

Les mesures es feien amb un potenciostat Metrohm (E506 Polarecord) i les dades s'enregistraven amb un sistema d'adquisició de dades Maclab ( $16$  bit,  $100$  kHz). El sistema Maclab (A and D instruments Ltd) es va usar també per aplicar el potencial a la cel·la. Tots els potencials s'indiquen respecte el de l'elèctrode de referència  $\text{Ag}/\text{AgCl}:\text{3.5 M KCl}$ . En els experiments amb cada un dels additius es va restar el valor del corrent capacitiu de les mesures de corrent experimental. El corrent capacitiu es va obtenir mesurant el corrent en un sistema amb l'additiu en la monocapa fosfolipídica, però sense  $\text{Tl}^+$  en la solució. En el cas del benzo- $\alpha$ -pirè, només es disposava del blanc corresponent a una concentració del  $6\%$ . Es va utilitzar aquest blanc amb totes les altes concentracions de benzo- $\alpha$ -pirè i es va suposar que aquest fet no tindria un impacte

massa important en els valors dels corrents respectius, ja que així s'havia observat en el *all-trans* retinol, on els blancs presentaven petits canvis d'una concentració a una altra.

## 12.3 El Model de Decaiment Exponencial de la Permeabilitat amb una Etapa Reversible

### 12.3.1 Els principis bàsics

Com hem vist en el capítol anterior, el Model de Permeabilitat Decaïent Exponencialment (model EDP) parteix d'una sèrie de suposicions que tenen en compte el transport màssic en solució, l'activitat dels canals i la translocació.

El transport de l'espècie permeant electroactiva M del si de la solució cap a la superfície de l'elèctrode es descriu amb difusió plana:

$$\frac{\partial c_M(x,t)}{\partial t} = D_M \frac{\partial^2 c_M(x,t)}{\partial x^2} \quad (12.1)$$

on  $D_M$  és el coeficient de difusió d'aquesta espècie.

Com ja s'ha descrit en el capítol anterior, l'origen de coordenades de l'aproximació monodimensional correspon a la interfase monocapa - solució (figura 12.1), i es considera un camp mig. Això significa que la concentració del ió permeant a qualsevol  $x$  (inclús a  $x=0$ ) i els setis conductors en la monocapa estan distribuïts uniformement.

Suposant difusió semi-infinita i un perfil inicial pla, existeix una relació (14,22) entre el flux de l'espècie electroactiva i la seva concentració a  $x=0$  en la interfície solució/monocapa:

$$c_M^* - c_M(0,t) = \int_0^t \frac{\sqrt{D_M} \left[ \frac{\partial c_M(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0}}{\sqrt{\pi(t-\tau)}} d\tau \quad (12.2)$$

En absència d'adsorció i d'acumulació de  $Tl^+$  en la monocapa (la qual cosa és força raonable, com s'ha discutit àmpliament a (7,14,22-26)), el corrent mesurat es pot obtenir del flux entrant de M a  $x=0$

$$I(t) = nFAD_M \left[ \frac{\partial c_M(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0} \quad (12.3)$$

Combinant les equacions (12.2) i (12.3), es pot obtenir, a partir dels corrents mesurats, la concentració promig de M a la superfície del lípid.

La definició de la permeabilitat local (14) com la relació entre el flux i la concentració de metall a la interfície monocapa-solució ha permès desacoblar la difusió del procés de translocació gràcies a la suposició de no adsorció:

$$P(t) \equiv \frac{D_M \left[ \frac{\partial c_M(x,t)}{\partial x} \right]_{x=0}}{c_M(0,t)} \quad (12.4)$$

La combinació d'aquestes tres darreres equacions porta a una expressió a partir de la qual es pot calcular el corrent ( $I$ ) a partir d'una determinada permeabilitat o a l'inrevés:

$$P(t) \left[ nFAc_M^* - \frac{1}{\sqrt{\pi D_M}} \int_0^t \frac{I(\tau) d\tau}{\sqrt{t-\tau}} \right] = I(t) \quad (12.5)$$

### 12.3.2 EDP sense pas reversible

En una primera aproximació(14), hem suposat un procés cinètic de primer ordre per la conversió de la forma conductora de la gramicidina ( $Gr^*$ ) a la forma no conductora, amb constants  $k_+$  per l'activació, i  $k_-$  per la desactivació, tal com s'ha descrit en el capítol anterior i en (6). Per altra banda, suposem un procés cinètic heterogeni de primer ordre pel pas a través dels canals, amb una constant de velocitat global  $k_2$  (relacionada principalment amb la deshidratació (7)), corresponent a l'esquema

$$c_M(0,t) \xrightarrow{k_2} c_{M^0}(\text{en Hg}) \quad (12.6)$$

Combinant el model d'interconversió de la gramicidina amb el model cinètic heterogeni de primer ordre s'obté la funció

$$P(t) = k_2 [Gr^*] = k_2 [Gr^*]_{\infty} + \left( k_2 [Gr^*]_0 - k_2 [Gr^*]_{\infty} \right) \cdot e^{-k_2 \cdot t} = P_{\infty} + P_{\Delta} \cdot e^{-k_2 \cdot t} \quad (12.7)$$

per la permeabilitat. El decaïment exponencial per la funcionalitat de la permeabilitat és l'origen del nom pel model de “Permeabilitat Decaïent Exponencialment” (“Exponentially Decaying Permeability” (EDP)) descrit en el capítol anterior.

La semiintegració dels corrents experimentals (equació (12.5)) ens permet obtenir la permeabilitat experimental i ajustar-la a la dependència funcional EDP (equació (12.7)) per obtenir els corresponents paràmetres  $P_{\infty}$ ,  $P_{\Delta}$  i  $k_2$ . En una segona fase, un cop es coneixen els valors d'aquests paràmetres, la solució numèrica de l'equació integral (12.5) ens permet obtenir el corrent a qualsevol temps i comparar-lo amb els valors experimentals originals (vegeu la figura 7.1).

El model ha demostrat la seva utilitat en els potencials més negatius, però evidencia algunes limitacions, com la manca d'ajust, a potencials més positius (vegeu la figura 12.2). Per tant, s'ha desenvolupat un model EDP millorat, que té en compte el pas revers per la deshidratació del  $Tl^+$  en el pas del canal(7).

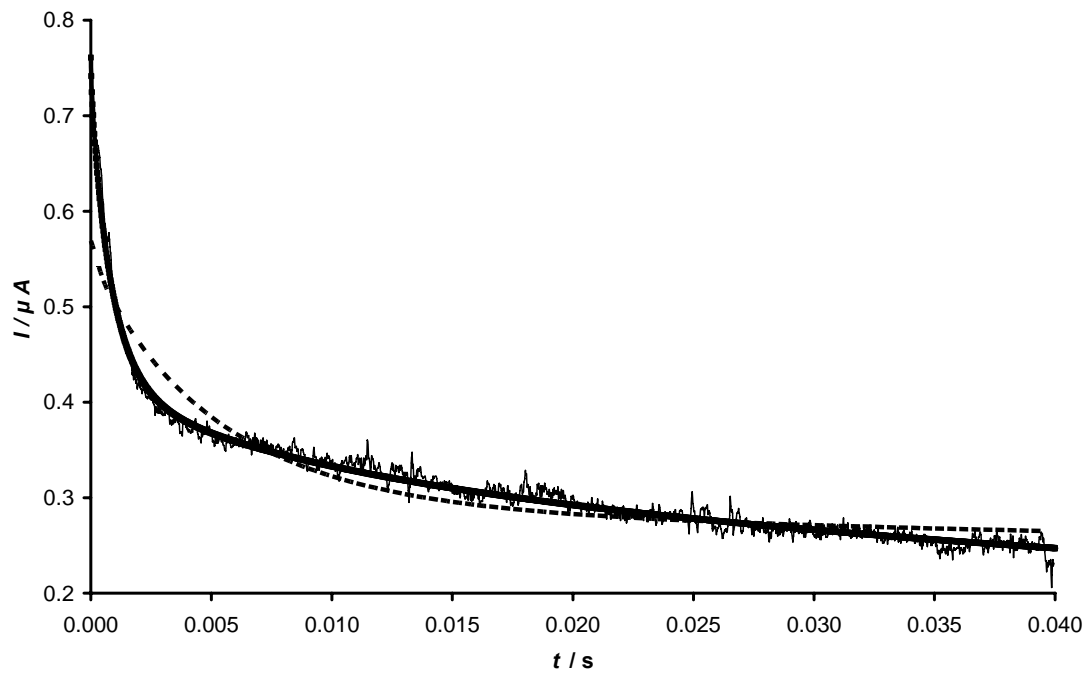
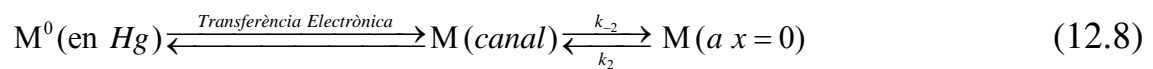


Figura 12.2: Gràfic dels corrents experimentals (línea prima oscil·lant) i els ajustos corresponents al model estàndar EDP (línea discontinua) i al model EDP refinat (línea contínua gruixuda).  $E=-0.4\text{ V}$ ,  $c_M^*=0.1\text{ mol}\cdot\text{m}^{-3}$ . Concentració de gramicidina:  $12.7\text{ nM}$ .

### 12.3.3 EDP amb pas reversible o EDP refinat

Ara refinem l'esquema descrit en l'equació (12.6) per incloure el pas revers per la deshidratació, amb una constant de velocitat  $k_{-2}$ , de l'espècie iònica  $\text{TI}^+$  seguida per una transferència electrònica reversible. L'esquema de la reacció es pot descriure com



Fent un balanç dels fluxos que deixen la solució, creuen els canals i entren a l'amalgama, es pot escriure

$$D_M \left( \frac{\partial c_M}{\partial x} \right)_{x=0} = k_2 \cdot c_M(0,t) \cdot Gr^* - k_{-2} \cdot c_M(\text{canal}) = D_{M^0} \left( \frac{\partial c_{M^0}}{\partial x} \right)_{x=-L} \quad (12.9)$$

en el mateix sistema de coordenades descrit en la figura 12.1.  $k_{-2}$  (en  $\text{m s}^{-1}$ ) és una constant de velocitat cinètica heterogènia de primer ordre, mentre  $k_2$  (en  $\text{m}^4 \text{mol}^{-1} \text{s}^{-1}$ ) és

una constant de velocitat de segon ordre. Cal adonar-se que la velocitat del flux de sortida d'un canal només depèn de la concentració del metall en el canal  $c_M(\text{canal})$  i no implica explícitament la concentració de gramicidina (si bé, implícitament, la quantitat de metall en un canal en un moment donat dependrà del nombre de canals actius de gramicidina que han estat ocupats).

Dividint l'equació (12.9) per  $c_M(0,t)$  i usant  $P(t)$  donada per l'equació (12.7), s'obté

$$\frac{I(t)}{nFAc_M(0,t)} = P_\infty + P_\Delta e^{-k_2 t} - k_{-2} \frac{c_M(\text{canal})}{c_M(0,t)} \quad (12.10)$$

Ara suposem equilibri nernstià en la superfície del mercuri, i usem el factor de preconcentració  $Y$  (27)

$$Y = \frac{c_{M^0}(-L,t)}{c_M(\text{canal})} = \exp\left\{-\frac{nF}{RT}(E - E_0)\right\} \quad (12.11)$$

on  $L$  denota l'amplada de la monocapa de lípid, i  $c_{M^0}(-L,t)$  correspon a la concentració de  $Tl^0$  tot just a la part interna de la superfície del mercuri. Així, l'equació (12.10) es pot escriure

$$\frac{I(t)}{nFAc_M(0,t)} = P_\infty + P_\Delta e^{-k_2 t} - \frac{k_{-2}}{Y} \frac{c_{M^0}(-L,t)}{c_M(0,t)} = P_\infty + P_\Delta e^{-k_2 t} - k_3 \frac{c_{M^0}(-L,t)}{c_M(0,t)} \quad (12.12)$$

on

$$k_3 \equiv \frac{k_{-2}}{Y} \quad (12.13)$$

Per tant, dels corrents experimentals podem trobar el valor dels paràmetres  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$ ,  $k_2$  i  $k_3$  (per un potencial donat) mitjançant un procediment d'ajust numèric si disposem dels valors de  $c_{M^0}(-L,t)$  i  $c_M(0,t)$ .

Aquests valors s'ha calculat de la següent manera:



i) el valor de  $c_M(0, t)$  s'obté de

$$c_M(0, t) = c_M^* - \frac{1}{nFA\sqrt{D_M}\pi} \int_0^t \frac{I(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (12.14)$$

que surt de combinar les equacions (12.2) i (12.3) .

ii)

$c_{M^0}(-L, t)$  es troba de l'equació de la càrrega elèctrica transferida  $Q(t)$ . El seu valor es pot expressar com

$$Q(t) = nFAD_{M^0} \int_0^t \left( \frac{\partial c_{M^0}}{\partial x} \right)_{x=-L} d\tau \quad (12.15)$$

i de la relació de Duhamel(28)

$$\int_0^t \left( \frac{\partial c_i(x, \tau)}{\partial x} \right)_{x=0} d\tau = \frac{-1}{\sqrt{\pi D_i}} \int_0^t \frac{c_i(0, \tau) - c_i^*}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (12.16)$$

es pot escriure

$$Q(t) = \int_0^t I(\tau) d\tau = nFA\sqrt{\frac{D_{M^0}}{\pi}} \int_0^t \frac{c_{M^0}(-L, \tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \quad (12.17)$$

Hem desenvolupat un programa informàtic escrit en llenguatge FORTRAN que permet calcular la integral numèrica del corrent i resoldre l'equació integral (12.17) per obtenir el valor de  $c_{M^0}(-L, t)$  .

Un cop es disposa dels valors de  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$ ,  $k_\Sigma$  i  $k_3$ , es poden simular els valors esperats pel corrent combinant les equacions (12.12) i (12.14) per obtenir

$$\frac{I(t)}{nFA} = \left( c_M^* - \frac{1}{nFA\sqrt{D_M}\pi} \int_0^t \frac{I(\tau)}{\sqrt{t-\tau}} d\tau \right) (P_\infty + P_\Delta e^{-k_\Sigma t}) - k_3 c_{M^0}(-L, t) \quad (12.18)$$

i comparar-los amb els valors experimentals.

La figura 12.2 mostra l'ajust dels corrents experimentals amb els models EDP i EDP refinat a un potencial ( $E=-0.4$  V) allunyat de les condicions limitades per difusió. El model EDP refinat mostra una millor coincidència amb els corrents experimentals que el model anterior, i el mateix es pot observar amb la permeabilitat recuperada (figura 12.3).

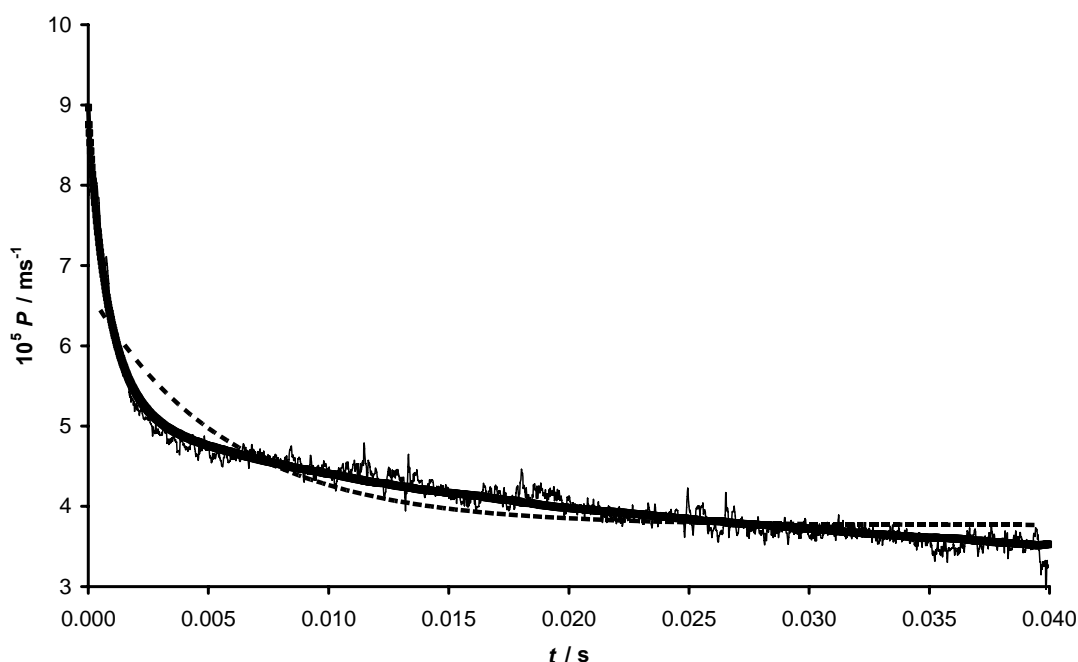


Figura 12.3: Gràfic de la permeabilitat experimental (línea oscil·lant) i els ajustos corresponents al model estàndar EDP (línea discontinua prima) i al model EDP refinat (línea contínua gruixuda) per la permeabilitat. Els paràmetres com en la figura 12.2. Els valors dels paràmetres obtinguts són: i) amb el model EDP estàndar:  $P_{\infty}=3.77 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ,  $P_{\Delta}=2.93 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$  i  $k_{\Sigma}=177.27 \text{ s}^{-1}$ ; ii) amb el model EDP refinat:  $P_{\infty}=5.78 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ,  $P_{\Delta}=3.18 \times 10^{-5} \text{ m s}^{-1}$ ,  $k_{\Sigma}=1053.74 \text{ s}^{-1}$  i  $k_3=1.11 \times 10^{-4} \text{ m s}^{-1}$ .

La incorporació de només un nou paràmetre,  $k_3$ , al model anterior millora l'ajust dels corrents i la permeabilitat allà on el model anterior mostrava més dificultats. D'acord amb la seva definició, - equació (12.13) -, en  $k_3$  hi estan implicats dos processos físics: i) el pas invers de la hidratació i, ii) la transferència electrònica reversible. La introducció del nou paràmetre permet un millor afinament de l'ajust amb un impacte lleu sobre el valor dels paràmetres  $P_{\infty}$  i  $P_{\Delta}$ , obtinguts amb el model EDP original

(vegeu els paràmetres obtinguts amb cada model en el peu de la figura 12.3). Un altre efecte de la introducció de  $k_3$  en el model és que la permeabilitat esperada no tendeix asimptòticament cap a  $P_\infty$  a temps molt llargs (com feia en el model EDP original), consistentment amb els valors decreixents observats experimentalment.

## 12.4 Resultats i discussió

En aquesta secció analitzem les tendències que segueixen els paràmetres obtinguts amb el model EDP refinat.

### 12.4.1 Impacte del potencial

Els marcadors quadrats plens de la figura 12.4 mostren que, quan no hi ha additiu (ni retinol ni benzo- $\alpha$ -pirè), el corrent augmenta a mesura que el potencial esdevé més negatiu fins que arriba a un màxim i llavors decreix lleugerament, com ja s'ha indicat prèviament en algun altre lloc (6,7). Aquest comportament suggereix dues regions o règims: un rang de potencials amb corrents creixents (de -0.375 V fins -0.5 V) i un altre rang ( $E < -0.5$  V) en el que el corrent assoleix un replà que pot relacionar-se amb la superfície del mercuri actuant com un “pou sense sola” (donat que pel Tal·li,  $E_0 = -0.420$  V vs Ag|AgCl) i qualsevol canvi posterior en els corrents podria ser atribuït a canvis en els canals conductors de gamicidina. S'observen comportaments similars quan s'afegeixen diferents quantitats d'additiu a la capa lipídica (vegeu la secció 4.2)

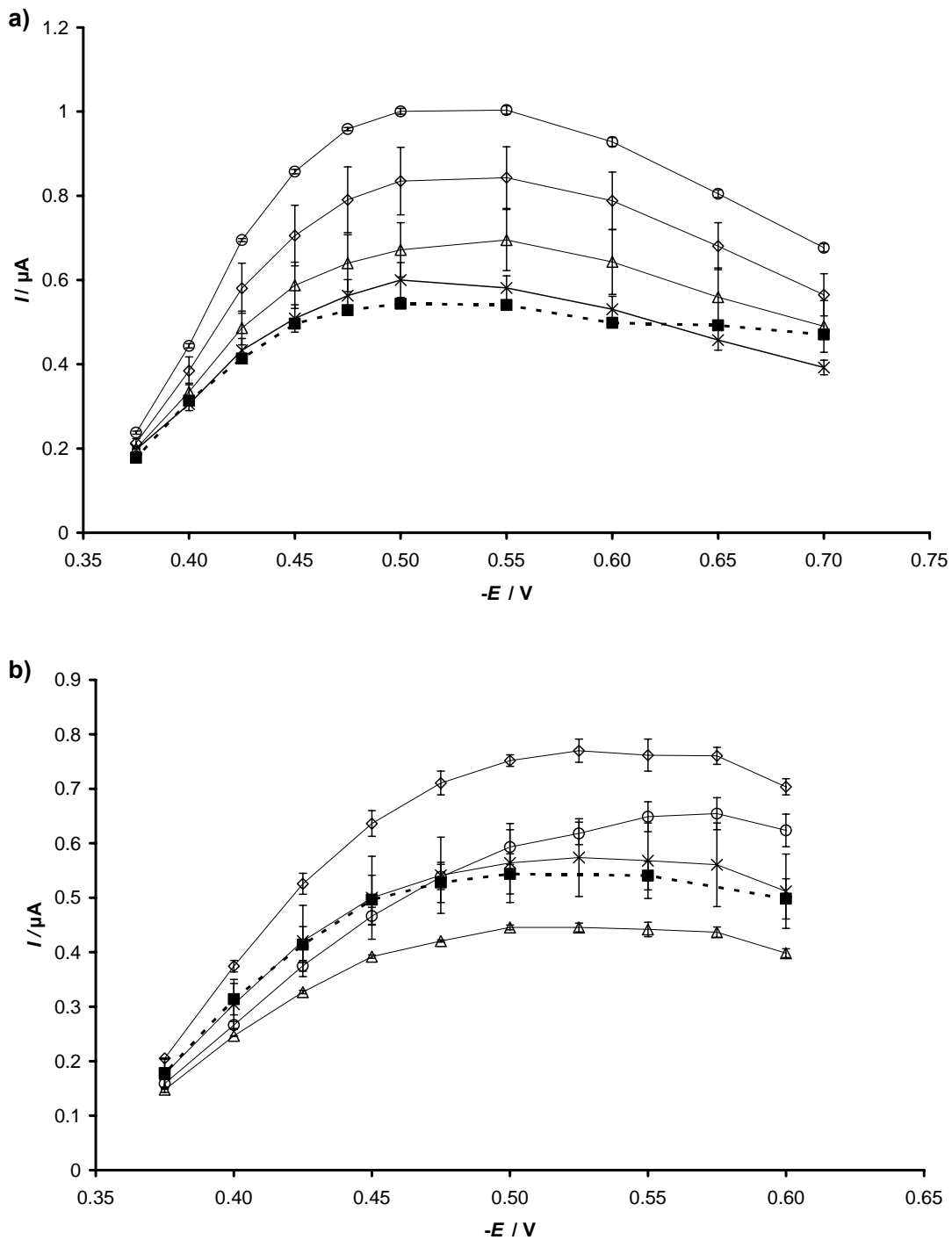
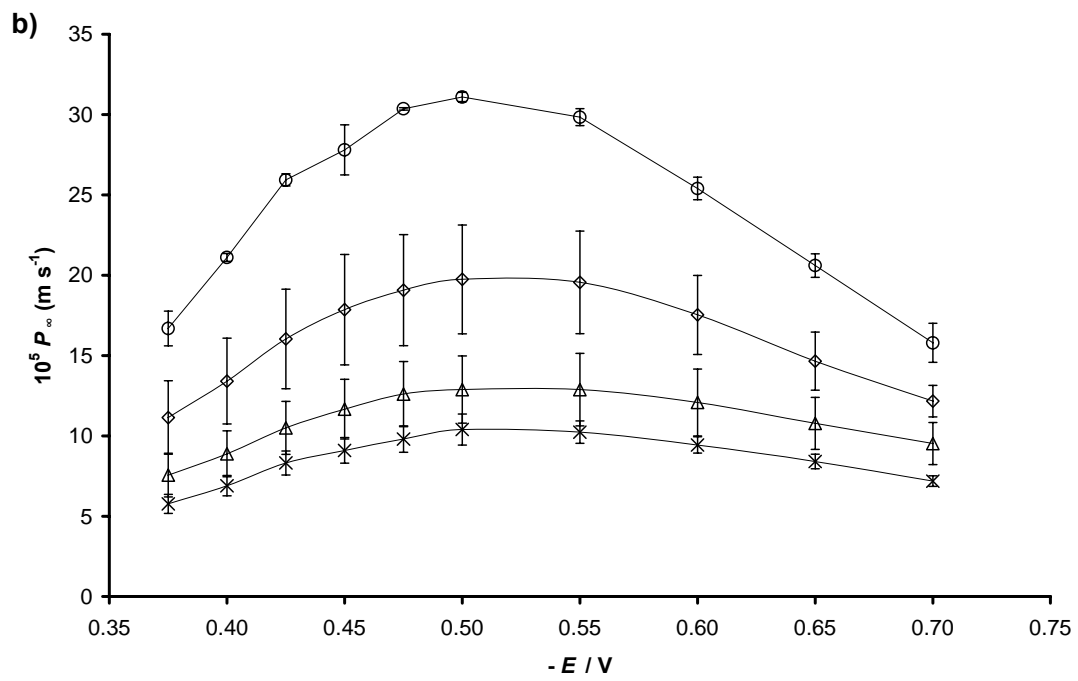
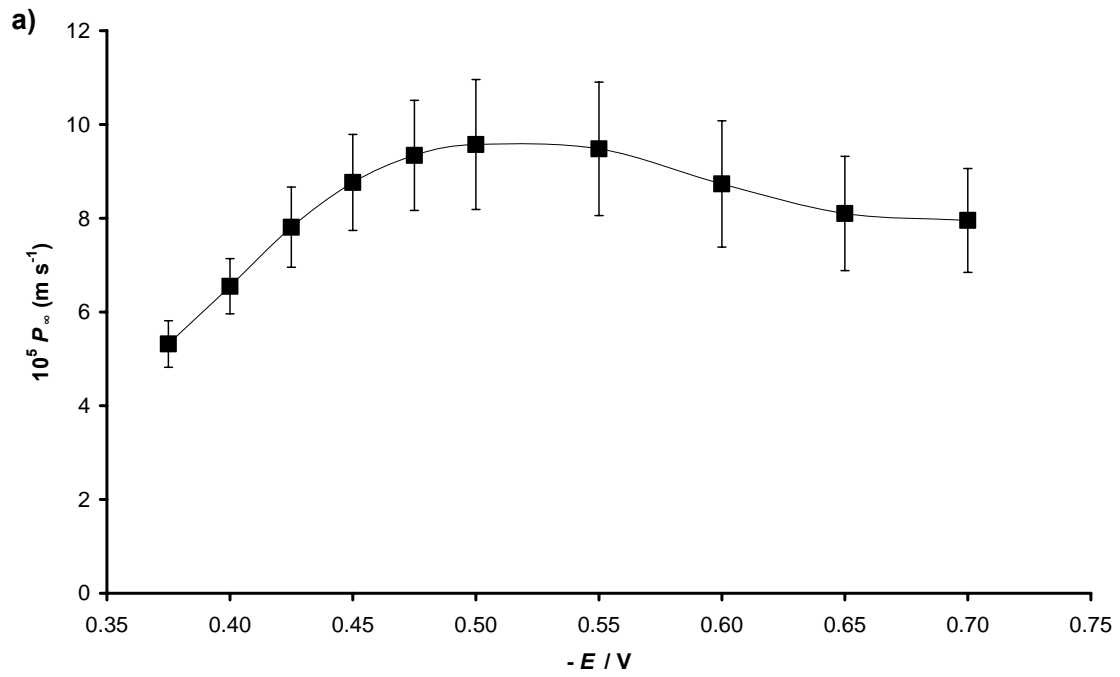


Fig. 12.4: Valors dels corrents experimentals als 20 ms de l'aplicació del pols de potencial a l'electrode recobert de DOPC. Panell a) amb l'additiu *all trans* retinol i panell b) amb benzo- $\alpha$ -pirè a les concentracions: 1.2% (×), 2.4% ( $\Delta$ ), 6% ( $\diamond$ ) i 12.7% ( $\circ$ ). Els marcadors quadrat plens (units amb la línia discontinua) corresponen als experiments sense additiu. La resta de paràmetres com en la figura 12.2.



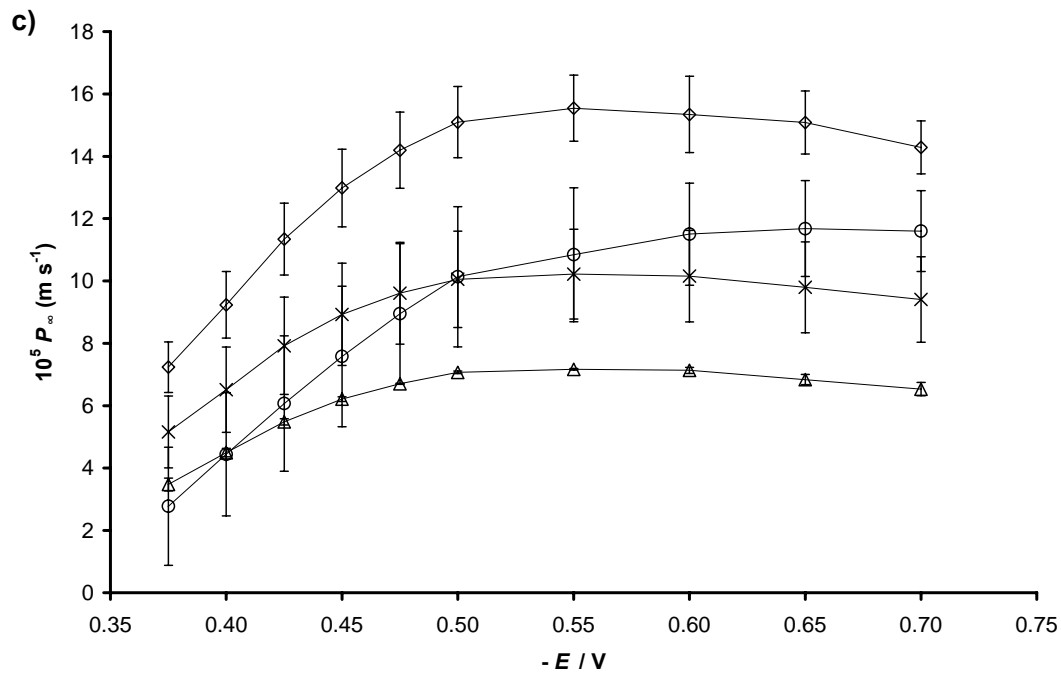


Fig. 12.5: Evolució del valor obtingut amb l'ajust de  $P_{\infty}$  amb el potencial. Els paràmetres restants com en la figura 12.2. **a)** Gramicidina sense additiu; **b)** Diferents quantitats afegides de *all trans* retinol; **c)** Diferents quantitats afegides de benzo- $\alpha$ -pirè. Els marcadors per les concentracions d'additiu en b) i c) com en la figura 12.4.

En la figura 12.5a, podem observar que el paràmetre  $P_{\infty}$ , calculat amb el model EDP refinat a partir dels corrents del sistema sense additiu, segueix essencialment el mateix patró que els corrents (com es veu en la figura 12.4):  $P_{\infty}$  augmenta des de  $E=-0.375$  V fins  $E=-0.5$  V, i a partir d'aquí es manté pràcticament constant.

El patró observat en les gràfiques del corrent i  $P_{\infty}$  versus el potencial suggereix que la màxima permeabilitat dels canals de gramicidina es dona quan els potencials aplicats són aproximadament entre 0.10 i 0.15 V més negatius que el punt de càrrega zero (PZC) del mercuri i disminueixen a potencials més positius o negatius. D'acord amb el model  $P_{\infty} = k_2 [Gr^*]_{\infty}$ , per tant una variació en la permeabilitat pot atribuir-se a una variació de la concentració de gramicidina activa en la capa i/o a una variació en la facilitat de pas dels ions. La posició negativa del potencials de la màxima conductivitat respecte el

potencial del PZC podria indicar que altres efectes podrien estar implicats en el pas del ió  $Tl^+$  a través del porus, tals com la competició entre el ió  $K^+$  de l'electrolit i el  $Tl^+$  per entrar en el canal i la dependència d'aquests fenòmens del potencial. Seran necessaris estudis posteriors per analitzar i establir aquests fets.

En canvi, per  $k_{\Sigma}$ , es pot observar un lleuger increment del seu valor amb potencials més negatius (vegeu la figura 12.6), que indica un assoliment més ràpid de l'equilibri entre les formes de la gramicidina.

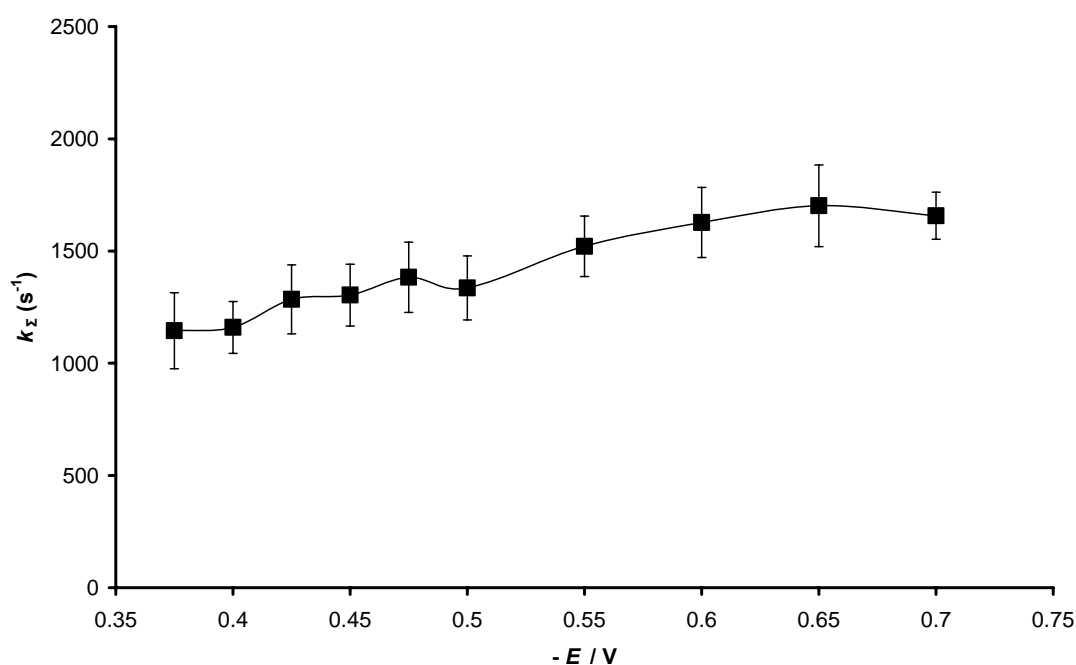
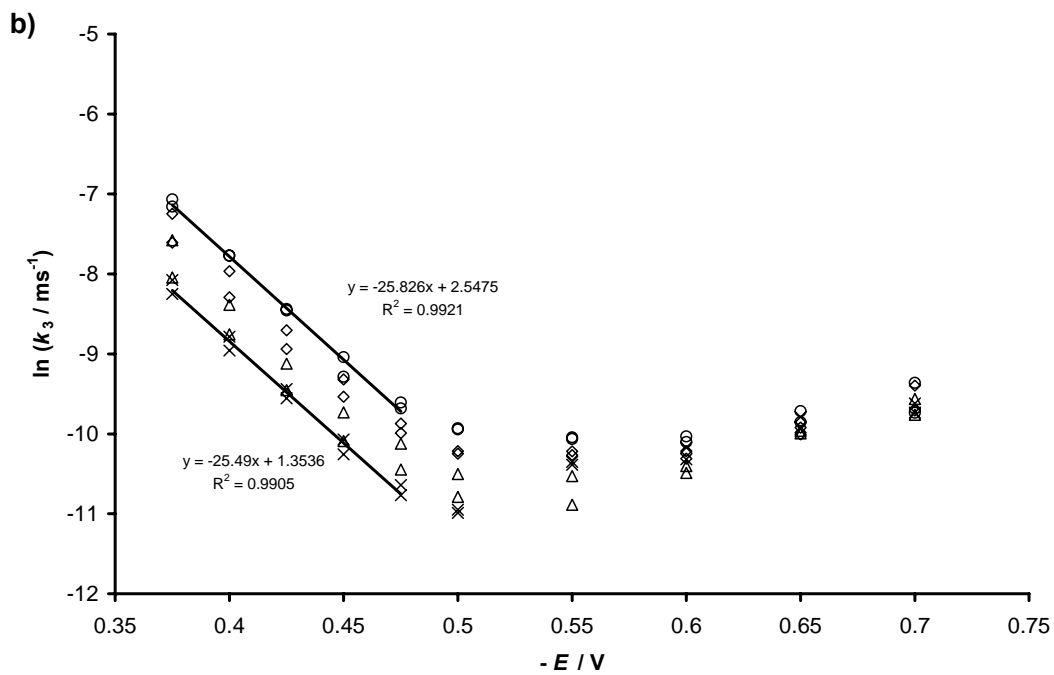
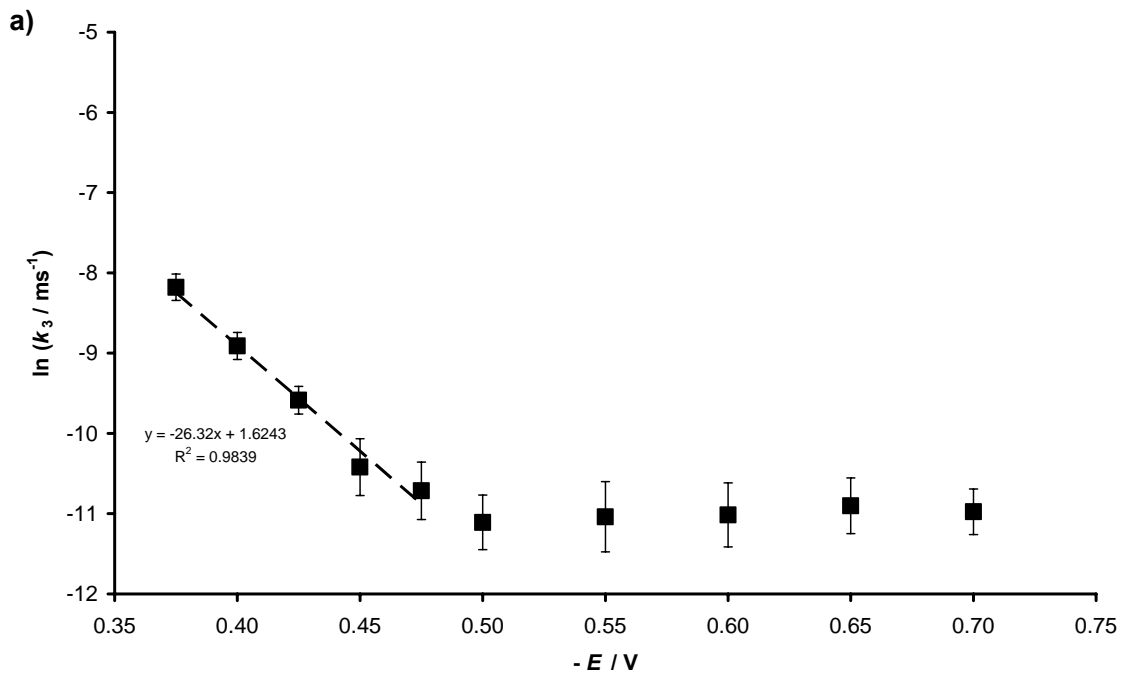


Fig 12.6 : Gràfica de la variació de  $k_{\Sigma}$  vs  $E$  (les barres d'error inclouen tres rèpliques) sense additiu en la capa lipídica. Paràmetres com en la figura 12.2.

Si representem  $\ln(k_3)$  en front el potencial, figura 12.7a, es poden observar dues zones de potencial diferents. Primer, en el rang de  $-0.375 V$  a  $-0.475 V$ , coincidint amb el rang de potencials amb corrents creixents de la figura 12.4, veiem un comportament lineal amb un pendent d'aproximadament  $-26.3 V^{-1}$ . Si tinguéssim un comportament nernstià perfecte, el pendent negatiu hauria de correspondre al valor de  $-nF/RT$ , i.e.  $-38.9 V^{-1}$ ,

per a un sistema que intercanvia un electró (com  $Tl^+|Tl^0$ ) ja que la manipulació de la definició de  $k_3$  i l'ús de l'equació (12.11) porten a

$$\ln k_3 = \ln \frac{k_{-2}}{Y} = C_1 + \frac{nF}{RT} E \quad (12.19)$$





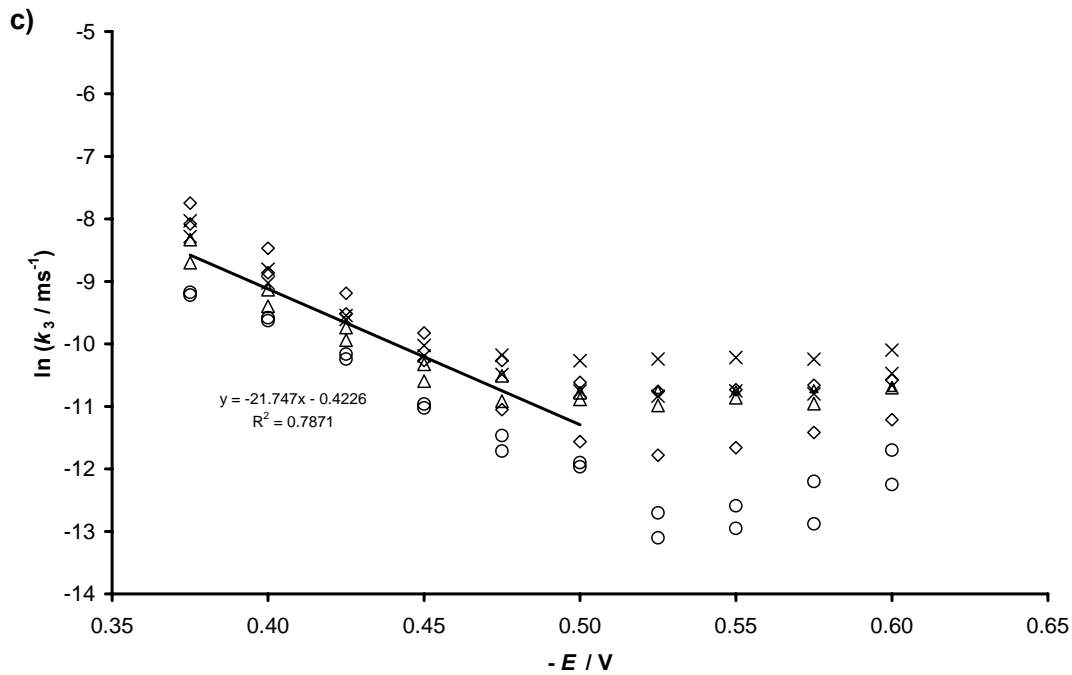


Figura 12.7: Gràfica dels valors de  $\ln(k_3)$  vs  $E$  per una solució: **a)** sense cap additiu (3 rèpliques); **b)** amb diferents quantitats afegides de *all trans* retinol i **c)** amb diferents quantitats de benzo- $\alpha$ -pirè. La resta de paràmetres com en la figura 12.2. Les línies rectes afegides ajusten una regió de comportament “quasi nernstià”: a) i c) ajust pel promig de totes les sèries; b) ajust per les concentracions més petita i més gran d’additiu. Els marcadors per les concentracions d’additiu a b) i c) com en la figura 12.4.

En la nostra gràfica apareix un comportament “quasi” nernstià, donat que els punt s’ajusten amb una línia recta de pendent negatiu. Una possibilitat sobre l’origen de la discrepància en els valors del pendents és que el valor de  $c_M(\text{canal})$  és tot just un promig de les concentracions dins de la monocapa i no correspon exactament a la concentració en contacte directe amb el Hg.

En la segona regió, per potencials més negatius, el corrent està limitat per la difusió i el valor del paràmetre  $k_3$  té una influència molt petita en l’ajust dels corrents experimentals i de la permeabilitat. Com es veu en la figura 12.7, el programa d’ajust dóna una mena de valor residual de la constant ( $\ln(k_3) \approx -11$ ).

## 12.4.2 Impacte del *all trans* retinol i del benzo- $\alpha$ -pirè afegits

### 12.4.2.1 Impacte en el corrent, en $P$ i en $P_{\infty}$

En la figura 12.4a podem veure que la presència de *all trans* retinol indueix corrents més grans que quan aquest és absent, i els corrents augmenten quan augmenta la concentració de *all trans* retinol. Amb el benzo- $\alpha$ -pirè (figura 12.4b), trobem un comportament irregular pel que fa a la variació del corrent amb la concentració d'additiu, que podria ser degut a la incertesa de les dades. En qualsevol cas, l'addició de *all trans* retinol produeix valors més grans de corrent que l'addició de benzo- $\alpha$ -pirè, per concentracions similars dels dos additius. Aquest fet suggereix que l'addició de *all trans* retinol estabilitza els canals de gramicidina i, així, ralentitza el decaïment del corrent i és menys pronunciat. Per tant, més canals es mantenen en la forma conductora. En aquest sentit, el *all trans* retinol demostra més eficàcia que el benzo- $\alpha$ -pirè (6).

Addicions de concentracions de benzo- $\alpha$ -pirè més grans d'un 6% donen lloc a una disminució del corrent indicant una reducció en l'activitat conductora dels canals. Un efecte com aquest no resulta sorprenent si tenim en compte la mida més gran de la molècula plana de benzo- $\alpha$ -pirè la qual podria interferir fàcilment amb les propietats conductores del canal. Tal vegada, el comportament irregular del benzo- $\alpha$ -pirè podria ser degut a que els blancs utilitzats no corresponen a aquestes concentracions de benzo- $\alpha$ -pirè per les que hem suposat una influència molt petita.

Resultats similars (i.e. permeabilitat augmentant en l'ordre: sense additiu < benzo- $\alpha$ -pirè < *all trans* retinol) s'observen quan representem la permeabilitat i l'evolució del corrent pels diferents additius (figures 12.8 i 12.9). Les dues figures mostren una molt bona coincidència entre els corrents i les permeabilitats experimentals (amb el model EDP refinat).

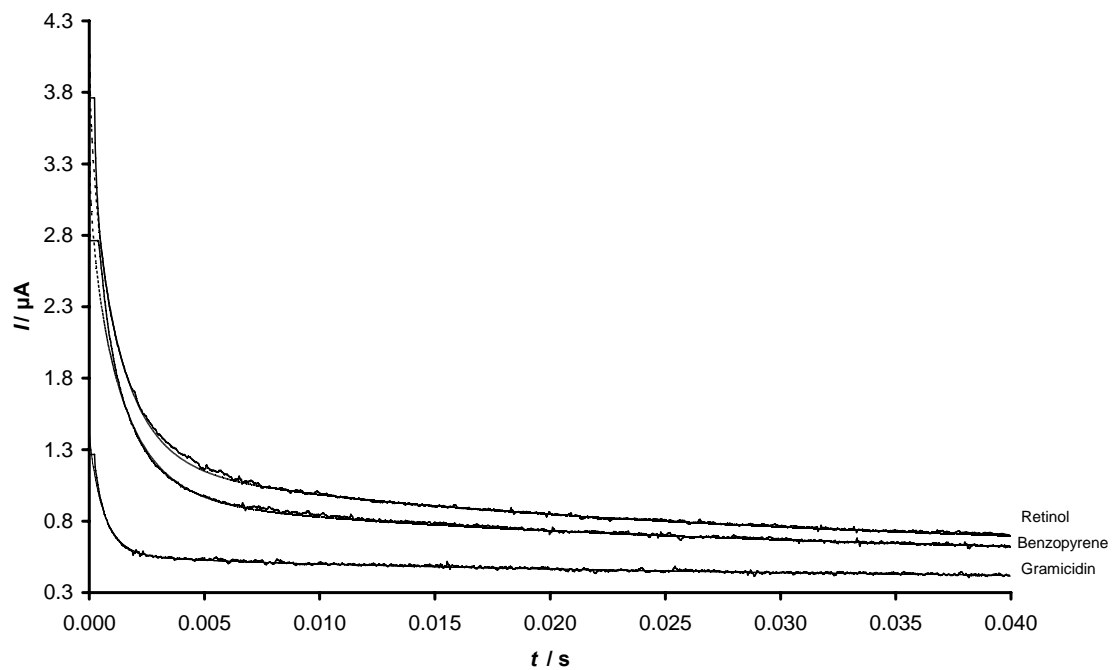


Fig. 12.8: Gràfiques dels corrents (línies oscil·lants) i els seus valors simulats (línies contínues) pel sistema amb gramicidina 12.7 nM: sense cap additiu (línia inferior), 6% de benzo- $\alpha$ -pirè (línia intermèdia) i 6 % de *all trans* retinol (línia superior). Potencial aplicat: -0.6 V. La resta de paràmetres com en la figura 12.2.

El comportament de la permeabilitat pot ser explicat en termes dels paràmetres involucrats. Així, en la figura 12.5b podem veure que a mesura que la concentració de *all trans* retinol augmenta,  $P_{\infty}$  també creix, per tant hi ha un nombre menor de canals conductors que s'han desactivat.

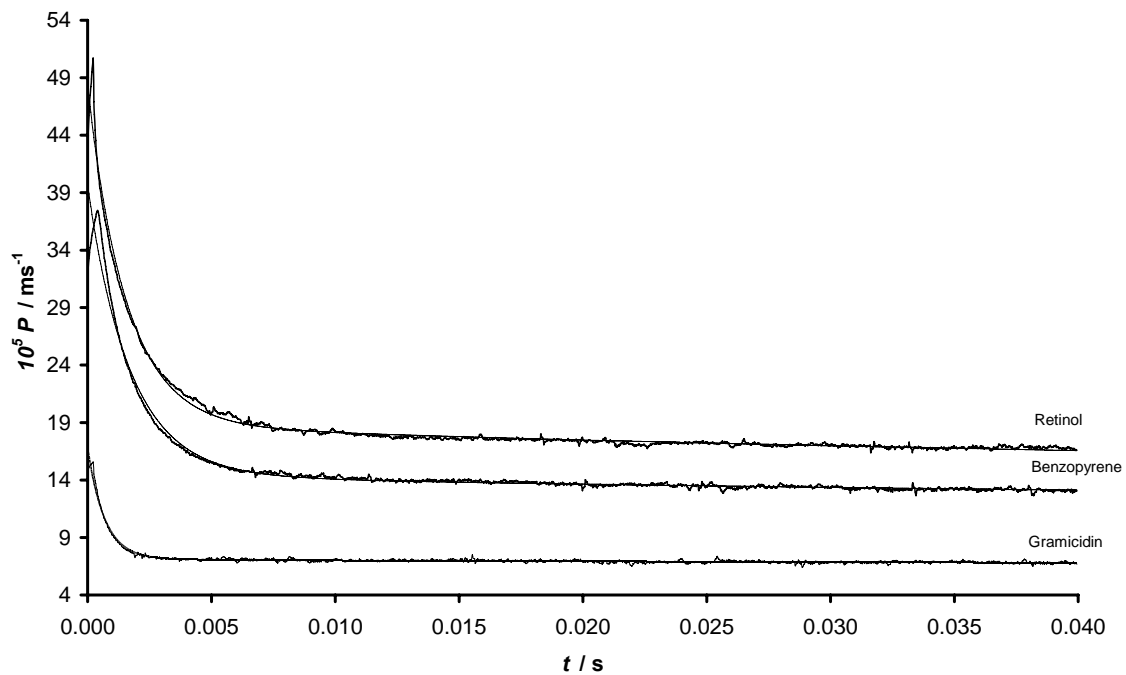
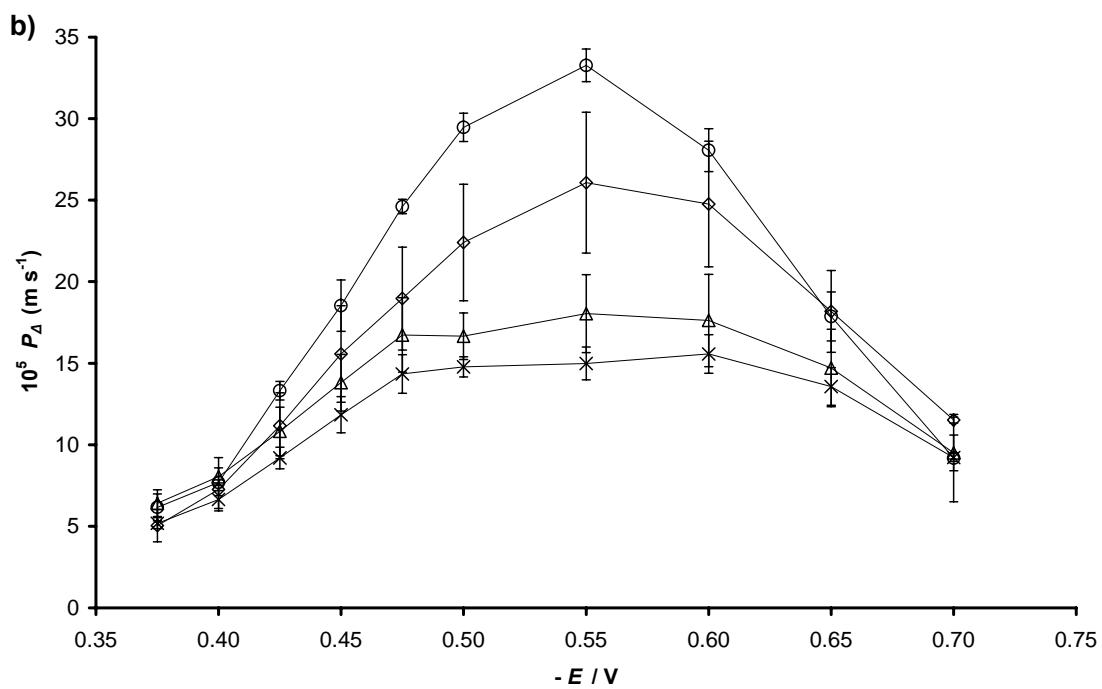
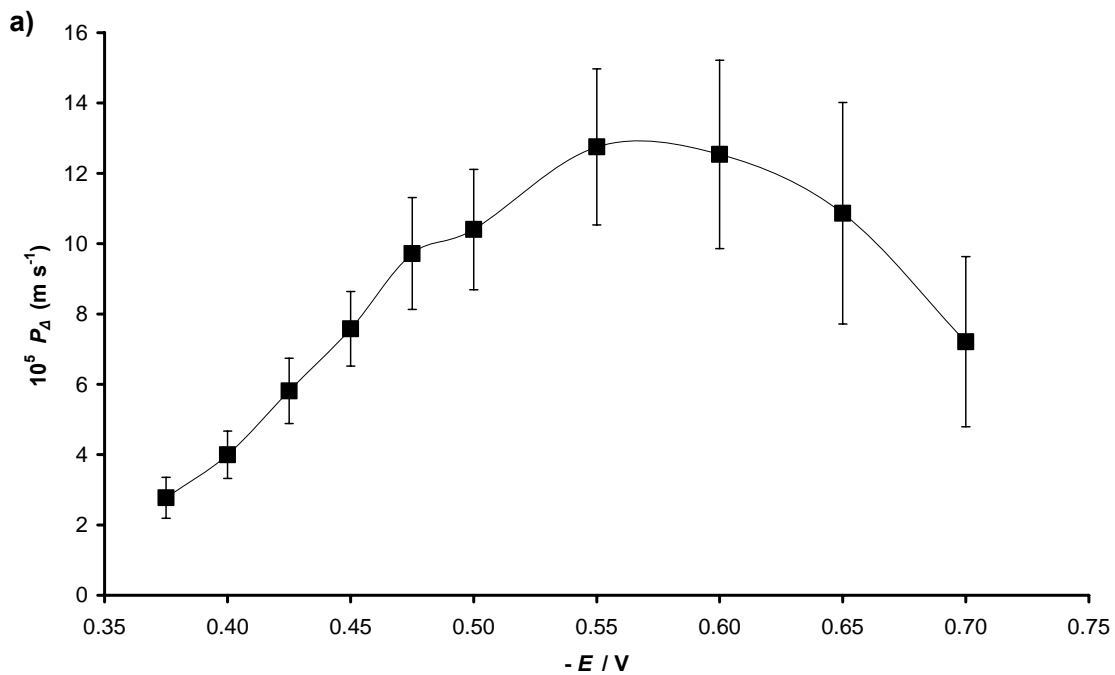


Fig. 12.9: Gràfiques de la permeabilitat: la mesurada (línea oscil·lant) i els valors recuperats (a partir dels paràmetres obtinguts en l'ajust; línies contínues) pel sistema amb una concentració de gramicidina 12.7 nM: sense additiu (línies inferiors), 6% de benzo- $\alpha$ -pirè (línies del mig) i 6 % de *all trans* retinol (línies superiors). Potencial aplicat: -0.6 V. La resta de paràmetres com en la figura 12.2.

Per altra banda, en la figura 12.5c, es pot observar un comportament irregular, similar al que es donava amb els corrents (figura 12.4b), amb les addicions creixents de benzo- $\alpha$ -pirè, indicant que  $I$  i  $P_{\infty}$  segueixen el mateix patró.

En qualsevol cas, sembla que aquestes quantitats afegides de *all trans* retinol canvien la permeabilitat dels porus, però no modifiquen l'autoensamblatge de la monocapa fosfolipídica o el dels canals, mentre que l'addició de benzo- $\alpha$ -pirè pot considerar-se més agressiva per aquestes estructures.



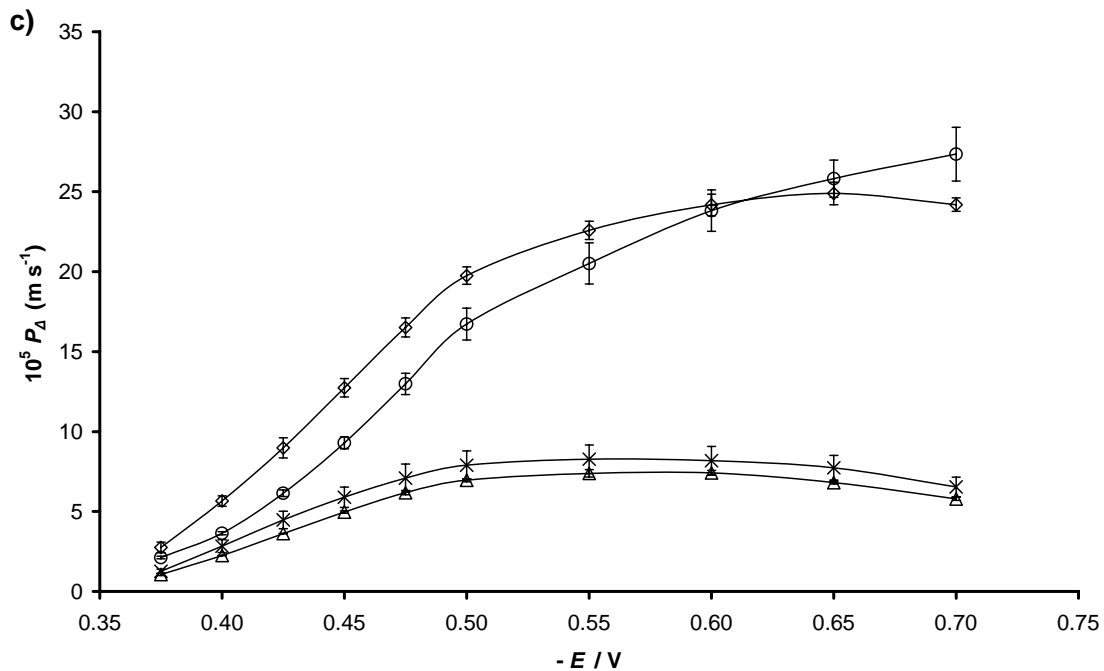


Fig. 12.10: Gràfica dels valors obtinguts de  $P_A$  vs  $E$ . Paràmetres com en la figura 12.2. a) Gramicidina sense additiu; b) Quantitats diferents de *all trans* retinol; c) Quantitats diferents de benzo- $\alpha$ -pirè. Els marcadors per les concentracions d'additiu en b) i en c) com en la figura 12.4.

El *all trans* retinol incrementa la permeabilitat de la gramicidina, ja que estabilitza el canal disminuint la velocitat de transformació a la forma no conductora. Aquest efecte pot ser explicat a escala molecular perquè els electrons  $\pi$  dels sistema policonjugat del retinol interactuen amb els quatre residus de triptòfan de la boca del canal. L'efecte del benzo- $\alpha$ -pirè és força més complex. Similarment al *all trans* retinol, disminueix la velocitat de transformació dels canals actius en no conductors interactuant amb els quatre residus de triptòfan (29) de la gramicidina. Per altra banda, no hi ha un marcat increment de la permeabilitat del canal. És més, en alguns cassos es nota una disminució de la permeabilitat dels canals.

---

### 12.4.2.2 Impacte en $P_{\Delta}$

$P_{\Delta}$  (amb o sense additiu) es comporta de manera similar a com ho fa  $P_{\infty}$  en la seva variació amb el potencial aplicat (figura 12.10). Apareixen dues regions de potencial: una, entre -0,35 V i -0,55 V, en la que  $P_{\Delta}$  augmenta monòtonament (vegeu la taula 1), i una segona regió, de potencials més negatius, on  $P_{\Delta}$  disminueix, reproduint el comportament general del corrent i de  $P_{\infty}$ .

Amb l'addició de *all trans* retinol, s'observa altre cop el comportament que mostrava  $P_{\infty}$ : amb addicions creixents de retinol, els valors observats de  $P_{\Delta}$  augmenten, i sempre són més grans que sense additiu (vegeu la figura 12.10b). Per altra banda, quan s'afegeix benzo- $\alpha$ -pirè (figura 12.10c), sembla que les concentracions petites d'additiu donen valors de  $P_{\Delta}$  menors que sense additiu, i que valors grans de concentració d'additiu donen valors de  $P_{\Delta}$  més grans, però encara menors que els obtinguts amb l'addició de la mateixa quantitat de *all trans* retinol.

	$P_{\infty} / (\text{m s}^{-1})$		$P_{\Delta} / (\text{m s}^{-1})$		$k_{\Sigma} / (\text{s}^{-1})$		$k_3 / (\text{m s}^{-1})$	
Sense Additiu	$6.55 \times 10^{-5} \pm 0.59 \times 10^{-5}$		$4.00 \times 10^{-5} \pm 0.67 \times 10^{-5}$		1159.73 $\pm$ 115.02		$1.36 \times 10^{-4} \pm 0.22 \times 10^{-4}$	
	Retinol	Benzopirè	Retinol	Benzopirè	Retinol	Benzopirè	Retinol	Benzopirè
1.2%	$6.90 \times 10^{-5} \pm$ $6.30 \times 10^{-6}$	$6.51 \times 10^{-5} \pm$ $1.36 \times 10^{-5}$	$6.64 \times 10^{-5} \pm$ $5.50 \times 10^{-6}$	$2.84 \times 10^{-5} \pm$ $4.00 \times 10^{-6}$	924.56 $\pm$ 50.37	634.27 $\pm$ 117.82	$1.41 \times 10^{-4} \pm$ $1.20 \times 10^{-5}$	$1.35 \times 10^{-4} \pm$ $1.50 \times 10^{-5}$
2.4%	$8.88 \times 10^{-5} \pm$ $1.43 \times 10^{-5}$	$4.50 \times 10^{-5} \pm$ $1.30 \times 10^{-6}$	$8.04 \times 10^{-5} \pm$ $1.17 \times 10^{-5}$	$2.25 \times 10^{-5} \pm$ $1.60 \times 10^{-7}$	1098.90 $\pm$ 168.37	428.02 $\pm$ 4.50	$1.93 \times 10^{-4} \pm$ $3.50 \times 10^{-5}$	$9.55 \times 10^{-5} \pm$ $1.26 \times 10^{-5}$
6%	$1.34 \times 10^{-4} \pm$ $2.67 \times 10^{-5}$	$9.24 \times 10^{-5} \pm$ $1.07 \times 10^{-5}$	$7.26 \times 10^{-5} \pm$ $1.32 \times 10^{-5}$	$5.66 \times 10^{-5} \pm$ $3.2 \times 10^{-6}$	520.47 $\pm$ 71.07	394.02 $\pm$ 33.15	$2.99 \times 10^{-4} \pm$ $4.90 \times 10^{-5}$	$1.76 \times 10^{-4} \pm$ $3.50 \times 10^{-5}$
12%	$2.11 \times 10^{-4} \pm$ $2.40 \times 10^{-6}$	$4.44 \times 10^{-5} \pm$ $1.98 \times 10^{-5}$	$7.70 \times 10^{-5} \pm$ $1.60 \times 10^{-6}$	$3.64 \times 10^{-5} \pm$ $1.00 \times 10^{-6}$	362.41 $\pm$ 24.64	187.94 $\pm$ 2.86	$4.22 \times 10^{-4} \pm$ $1.00 \times 10^{-6}$	$6.75 \times 10^{-5} \pm$ $1.55 \times 10^{-6}$

Taula 12.1: Valors de les constants obtingudes per diferents concentracions d'additiu a -0.4 V.



### 12.4.2.3 Impacte en $k_{\Sigma}$

$k_{\Sigma}$  disminueix quan s'afegeix *all trans* retinol o benzo- $\alpha$ -pirè (figura 12.11). Aquesta disminució no segueix una tendència lineal amb la concentració d'additiu, però la disminució és més significativa a concentracions baixes. La disminució, des del valor comú de quan no hi ha additiu, és més gran pel benzo- $\alpha$ -pirè que pel *all trans* retinol a baixes concentracions, la qual cosa pot ser relacionada amb alguna mena d'empaquetament del benzo- $\alpha$ -pirè al voltant dels canals de gramicidina (un empaquetament de pirè s'ha observat en bicapes fosfolipídiques (30-32)). Per concentracions més grans d'additiu,  $k_{\Sigma}$  tendeix a valors similars pels dos additius.

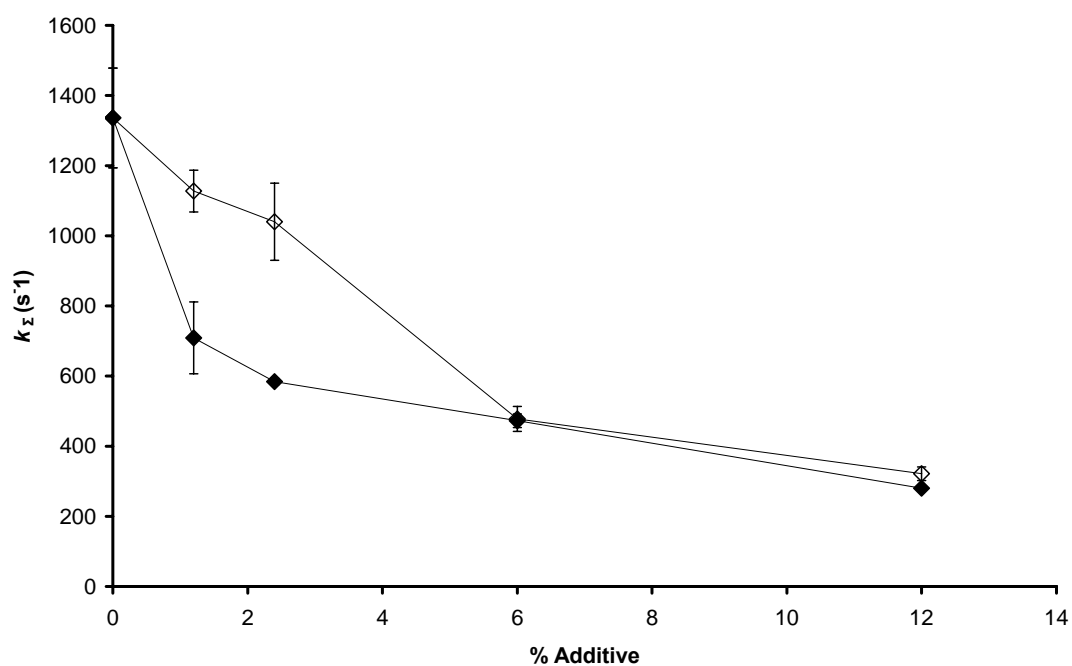


Fig. 12.11: Evolució de  $k_{\Sigma}$  amb la concentració afegida de *all trans* retinol (diamants buits) i benzo- $\alpha$ -pirè (diamants plens) per  $E=-0.500$  V.

#### 12.4.2.4 Impacte en $k_3$

Com podem veure en la figura 12.7b, en la regió quasi nernstiana de potencials, dues línies, pràcticament paral·leles representen l'evolució de  $\ln(k_3)$  amb el potencial per les addicions més diluïda i més concentrada de *all trans* retinol. Les dues línies mostren gairebé el mateix valor pel pendent (al voltant de  $-26 \text{ V}^{-1}$ ), el qual –afegit al pendent de gramicidina sola (aproximadament  $-26 \text{ V}^{-1}$  en la figura 12.7a) i al pendent del benzo- $\alpha$ -pirè ( $-22 \text{ V}^{-1}$  en la figura 12.7c) - reflecteixen que la concentració d'additiu té un impacte petit en les etapes de la (des)hidratació i la transferència electrònica reversible.

### 12.5 Conclusions

El concepte de permeabilitat variable ens permet desacoblar la difusió del procés de translocació i pot ser aplicat a qualsevol arranjament de canals iònics sobre una membrana d'una capa o una doble capa de fosfolípids en la que s'usa una sonda redox per investigar el seu funcionament. El model simple de Permeabilitat Decaïent Exponencialment (EDP) descriu el comportament de conjunt de la permeabilitat en termes d'un decaïment dels canals actius de gramicidina. Entre les limitacions d'aquest model senzill apareix la falta de justificació del lleu decreixement dels corrents i la permeabilitat a temps llargs.

Una versió millorada del model EDP, que té en compte un pas reversible per l'etapa de la hidratació, permet un ajust millorat de les dades i el processat dels fluxos a potencials no necessàriament corresponents a les condicions limitades per difusió. El nou paràmetre  $k_3$  segueix una dependència quasi nernstiana amb el potencial a potencials més positius d'aquells característics de les condicions limitades per difusió.

Els additius analitzats tenen una estructura molecular que pot interactuar amb els residus de triptòfan localitzats a la boca dels canals de gramicidina, donant lloc a una modificació de la permeabilitat dels canals.

L'addició de *all trans* retinol o benzo- $\alpha$ -pirè a la monocapa ralentitza el decaïment de la permeabilitat i incrementa la intensitat de corrent comparat amb la monocapa sense additius. El primer compost és més efectiu que el benzo- $\alpha$ -pirè en establir els canals actius. Aquest efecte d'estabilització dels canals pels additius podria ser deguda a interaccions moleculars amb la gramicidina, disminuint la velocitat de conversió a la forma no activa de la gramicidina.

Començant des d'un valor comú corresponent a quan no hi ha additiu,  $P_{\infty}$  augmenta i  $k_{\Sigma}$  disminueix amb l'augment de concentració dels additius. Aquesta variació no és lineal amb la concentració d'additiu (figura 12.11), cosa que podria interpretar-se a partir d'un empaquetament dels compost al voltant del canal.

Pel que fa a l'efecte del potencial sobre els paràmetres, podem observar que per una concentració fixa d'additiu, s'observen valors creixents dels corrents i les permeabilitats entre els potencials -0.35 V i -0.5V. Per potencials més negatius, els corrents i les permeabilitats disminueixen. Això podria suggerir una disminució en l'estabilitat dels canals per aquests valors i/o una competència del  $Tl^{+}$  amb altres cations (i.e.  $K^{+}$ ) o altres efectes conformacionals sobre la permeabilitat.

S'observa una lleugera dependència de  $k_{\Sigma}$  i  $P_{\infty}$  amb el potencial.  $k_3$  mostra un comportament diferent a potencials més positius de -0.5 V (quasi-nernstià) que a potencials molt negatius (pràcticament no varia).

## 12.6 Referències

1. Nelson, A.; Auffret, N. Interaction of xenobiotics with mercury-adsorbed phospholipid monolayers. *Mar. Environ. Res.* **1988**, *24*, 51-56.
2. Nelson, A.; Auffret, N. Phospholipid monolayers of di-oleoyl lecithin at the mercury water interface. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *244*, 99-113.
3. Nelson, A.; Auffret, N.; Readman, J. Initial applications of phospholipid-coated mercury-electrodes to the determination of polynuclear aromatic-hydrocarbons and other organic micropollutants in aqueous systems. *Anal. Chim. Acta* **1988**, *207*, 47-57.
4. Nelson, A.; Auffret, N. Phospholipid monolayers of di-oleoyl lecithin (DI-O-PC) at the mercury water interface - Effects on faradaic reactions. *J. Electroanal. Chem.* **1988**, *248*, 167-180.
5. Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Nelson, A.; Guidelli, R. Electrochemical modeling of electron and proton transfer to ubiquinone-10 in a self-assembled phospholipid monolayer. *Biophys. J.* **1996**, *70*, 2716-2726.
6. Nelson, A. Conducting gramicidin channel activity in phospholipid monolayers. *Biophys. J.* **2001**, *80*, 2694-2703.
7. Becucci, L.; Moncelli, M. R.; Guidelli, R. Thallous ion movements through gramicidin channels incorporated in lipid monolayers supported by mercury. *Biophys. J.* **2002**, *82*, 852-864.
8. Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Guidelli, R. The intrinsic pK(a), values for phosphatidylcholine, phosphatidylethanolamine, and phosphatidylserine in monolayers deposited on mercury-electrodes. *Biophys. J.* **1994**, *66*, 1969-1980.
9. Moncelli, M. R.; Becucci, L.; Buoninsegni, F. T.; Guidelli, R. Surface dipole potential at the interface between water and self-assembled monolayers of phosphatidylserine and phosphatidic acid. *Biophys. J.* **1998**, *74*, 2388-2397.
10. Quist, A. P.; Chand, A.; Ramachandran, S.; Daraio, C.; Jin, S.; Lal, R. Atomic force microscopy imaging and electrical recording of lipid bilayers supported over microfabricated silicon chip nanopores: Lab-on-a-chip system for lipid membranes and ion channels. *Langmuir* **2007**, *23*, 1375-1380.
11. Terrettaz, S.; Mayer, M.; Vogel, H. Highly electrically insulating tethered lipid bilayers for probing the function of ion channel proteins. *Langmuir* **2003**, *19*, 5567-5569.
12. Becucci, L.; Moncelli, M. R.; Guidelli, R. Ion carriers and channels in metal-supported lipid bilayers as probes of transmembrane and dipole potentials. *Langmuir* **2003**, *19*, 3386-3392.
13. Gritsch, S.; Nollert, P.; Jahnig, F.; Sackmann, E. Impedance spectroscopy of porin and gramicidin pores reconstituted into supported lipid bilayers on indium-tin-oxide electrodes. *Langmuir* **1998**, *14*, 3118-3125.
14. Monné, J.; Galceran, J.; Puy, J.; Nelson, A. Ion fluxes to channel arrays in monolayers. Computing the variable permeability from currents. *Langmuir* **2003**, *19*, 4694-4700.
15. Suchyna, T. M.; Tape, S. E.; Koeppe, R. E.; Andersen, O. S.; Sachs, F.; Gottlieb, P. A. Bilayer-dependent inhibition of mechanosensitive channels by neuroactive peptide enantiomers. *Nature* **2004**, *430*, 235-240.

16. N'soukpoe-Kossi, C. N.; Sedaghat-Herati, R.; Ragi, C.; Hotchandani, S.; Tajmir-Riahi, H. A. Retinol and retinoic acid bind human serum albumin: Stability and structural features. *Int.J.Biol.Macromol.* **2007**, *40*, 484-490.
17. Thiele-Bruhn, S.; Brummer, G. W. Kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) degradation in long-term polluted soils during bioremediation. *Plant Soil* **2005**, *275*, 31-42.
18. Nelson, A.; Auffret, N.; Borlakoglu, J. Interaction of hydrophobic organic-compounds with mercury adsorbed dioleoylphosphatidylcholine monolayers. *Biochim.Biophys.Acta* **1990**, *1021*, 205-216.
19. Nelson, A.; Bizzotto, D. Chronoamperometric study of Tl(I) reduction at gramicidin- modified phospholipid-coated mercury electrodes. *Langmuir* **1999**, *15*, 7031-7039.
20. Hladky, S. B.; Haydon, D. A. Ion movements in gramicidin channels. *Current Topics in Membranes and Transport* **1984**, *21*, 327-372.
21. Broniatowski, M.; Suarez, M. N.; Romeu, N. V.; Dynarowicz-Latka, P. Gramicidin A channel in a matrix from a semifluorinated surfactant monolayer. *J.Phys.Chem.B* **2006**, *110*, 19450-19455.
22. Oldham, K. B.; Myland, J. C. *Fundamentals of Electrochemical Science*, Academic Press: San Diego, 1994.
23. Oldham, K. B. Convolution - A General Electrochemical Procedure Implemented by a Universal Algorithm. *Anal.Chem.* **1986**, *58*, 2296-2300.
24. Oldham, K. B. Interrelation of Current and Concentration at Electrodes. *J.Appl.Electrochem.* **1991**, *21*, 1068-1072.
25. Mahon, P. J.; Oldham, K. B. Incorporating electrode kinetics into the convolutive modeling of reactions at planar, cylindrical and spherical electrodes. *Electrochim.Acta.* **2001**, *46*, 953-965.
26. Hepel, M. Ion channeling phenomena and Tl-upd induced film dynamics in model biomembranes studied with EQCN and QCI techniques. *J.Electroanal.Chem.* **2001**, *509*, 90-106.
27. Galceran, J.; Companys, E.; Puy, J.; Cecília, J.; Garcés, J. L. AGNES: a new electroanalytical technique for measuring free metal ion concentration. *J.Electroanal.Chem.* **2004**, *566*, 95-109.
28. Cecília, J.; Galceran, J.; Salvador, J.; Puy, J.; Mas, F. Numerical procedures in electrochemical simulation. *Int.J.Quantum Chem.* **1994**, *51*, 357-367.
29. Andersen, O. S.; Koeppe, R. E.; Roux, B. Gramicidin channels. *IEEE T.Nanobiosci.* **2005**, *4*, 10-20.
30. Engelke, M.; Behmann, T.; Ojeda, F.; Diehl, H. A. Heterogeneity of microsomal membrane fluidity - Evaluation using intrinsic tryptophan energy-transfer to pyrene probes. *Chem.Phys.Lipids* **1994**, *72*, 35-40.
31. Engelke, M.; Klockmann, H. C.; Diehl, H. A. Gramicidin affects the transverse and lateral distribution of pyrene and pyrene derived probes in lipid bilayers. *Spectrochim.Acta A* **1996**, *52*, 85-91.
32. Engelke, M.; Bojarski, P.; Diehl, H. A.; Kubicki, A. Protein-dependent reduction of the pyrene excimer formation in membranes. *J.Membrane Biol.* **1996**, *153*, 117-123.



## IV. Conclusions





En aquest treball s'ha estudiat la modelització de fenòmens interfacials acoblats amb difusió que es donen en diverses situacions d'interès en l'àmbit electroquímic, medioambiental o fisiològic. Els sistemes objectes d'estudi comprenen bàsicament una espècie activa (generalment un catió metàl·lic), amb presència, o no, de lligands complexants. L'espècie activa experimenta un procés superficial a través d'una membrana o interfície de separació respecte un altre medi on aquesta pot ser reduïda o senzillament internalitzada. Els fenòmens físics implicats són la difusió en el si de la solució o el medi natural, l'adsorció sobre la superfície o membrana i el procés de la reducció o internalització amb la cinètica corresponent.

La metodologia de treball ha consistit en seleccionar els fenòmens físics rellevants en cada sistema objecte d'estudi, formular matemàticament les equacions corresponents, buscar l'estratègia de resolució i interpretar físicament els resultats. De vegades, els models obtinguts s'han utilitzat per contrastar hipòtesis o analitzar les possibilitats de treball en condicions sintètiques diferents de les experimentals.

Aquesta metodologia s'ha aplicat a tres sistemes diferents:

a) Senyals obtinguts en les tècniques voltamperomètriques de la polarografia normal d'impulsos (NPP) i polarografia inversa d'impulsos (RPP), utilitzant el mètode d'Elements Finites de Galerkin com a eina de simulació i contrastant els resultats simulats amb els obtinguts experimentalment de les valoracions voltamperomètriques dels sistemes Zn-PMA i Cd-PMA.

b) El segon sistema que s'ha simulat considera la bioassimilació, espontània u obligada, de metalls per part de microorganismes aquàtics. Les dades dels fluxos simulats s'han contrastat amb les dades experimentals de les quantitats acumulades de  $Pb^{2+}$  per part de l'alga *Chlorella vulgaris* sota condicions controlades.

c) El tercer sistema simulat és el de l'electroreducció d'un metall sobre un elèctrode de gota de mercuri recobert d'una membrana de fosfolípids modificada amb canals iònics de gramicidina, que possibiliten la permeació i la qual exhibeix una dependència amb el potencial aplicat. El mètode s'ha contrastat amb els corrents experimentals obtinguts en la reducció de  $Tl^+$  sobre un elèctrode de mercuri recobert de DOPC i sembrat de gramicidina.

La conclusió principal de la tesi, des d'un punt de vista general, és la viabilitat de modelar amb èxit sistemes interfacials diferents amb la consideració de pocs fenòmens físics rellevants. Evidentment, la inclusió de més fenòmens o la consideració més refinada dels processos considerats ha de permetre l'obtenció de resultats més acurats i precisos, però a costa d'una complicació del formalisme i d'un refinament en els mètodes de càlcul molt importants. L'ús, però, de sistemes menys sofisticats com els nostres, permet fer estimacions no gens grosseres, i amb un cost francament baix, de valors de constants o del impacte de determinats factors sobre els sistemes estudiats, que poden tenir un interès gran quan s'apliquin sobre els sistemes experimentals.

A nivell més particular, i concretant sobre cada sistema considerat, les conclusions extretes són:

Pel que fa al primer sistema

1. La implementació del mètode d'Elements Finitos de Galerkin (GFEM) permet el càlcul dels corrents límits en sistemes en qualsevol proporció metall-ligand en els que la complexació sigui làbil. La possibilitat de simular els perfils de concentració de les diverses espècies implicades permet entendre millor les respostes obtingudes.
2. En absència d'adsorció, els corrents límits NPP i RPP no difereixen significativament per cap relació de concentracions metall-ligand. Per tant,

poden usar-se, en aquests casos, les expressions desenvolupades per NPP, que són més senzilles, per interpretar els corrents obtinguts en qualsevol de les dues tècniques.

3. L'adsorció té poc impacte en el corrent límit RPP. La influència mínima es dona en condicions d'excés de lligand ( $c_{T,M}^* \rightarrow 0$ ). El corrent límit RPP no es veu afectat per l'adsorció de complex, mentre que l'adsorció de lligand afegeix un error en la determinació de la constant d'estabilitat que depèn del valor de la relació entre els valors dels coeficients de difusió del metall i del lligand, ( $\varepsilon$ ), la qual, per tant, influeix en l'error en el valor obtingut de la constant d'estabilitat del sistema.
4. La representació gràfica de  $\phi$  en front de  $c_{T,M}^*$  pot servir com un bon indicador de l'excés de lligand assolit pel sistema. S'han obtingut expressions aproximades per aquestes gràfiques, que poden usar-se per obtenir  $\bar{\phi}$  o  $K$  en aquelles situacions en les que el valor més baix de concentració de metall total experimental no assoleixen la regió en la que s'aplica la condició d'excés de lligand.
5. Hi ha bona concordança entre les constants d'estabilitat obtingudes ajustant les representacions gràfiques de  $\bar{\phi}$  en front de  $c_{T,M}^*$  per diferents valors de concentració total de lligand i les descrites en la literatura pels sistemes Zn-PMA i Cd-PMA. El valor mitjà de  $K$  obtingut amb aquesta metodologia permet reproduir amb èxit, usant les expressions corresponents a excés de lligand, els valors de corrent límit  $\phi$  obtinguts per extrapolació de les gràfiques de  $\phi$  en front de  $c_{T,M}^*$ .

---

En relació amb la modelització de la bioassimilació en el cas d'adsorció lineal,

6. Disposem d'expressions analítiques per a determinar la concentració superficial, els fluxos i les quantitats acumulades de metall al llarg de l'evolució de la bioassimilació. Aquestes expressions (amb paràmetres habituals) recolzen la validesa de la informació que s'obté de les anàlisis dels fluxos suposant l'estat estacionari. Però també es posa de manifest que per determinades combinacions dels paràmetres se'n segueix una pèrdua significativa de precisió d'aquesta informació degut a la llarga durada del període transitori.
7. El coneixement de les quantitats acumulades de metall a temps llargs, permet determinar el valor del producte  $k \cdot K_H$ , però l'elucidació del valor individual d'aquestes constants requereix disposar d'informació del període transitori.
8. El mètode ISSA (Instantaneous Steady-State Approximation), que permet determinar el valor de  $K_H$  a partir de la regressió lineal de l'expressió aproximada de la quantitat acumulada amb el temps s'ha validat a partir de dades experimentals, i els valors recuperats amb la seva implementació coincideixen satisfactòriament amb els valors corresponents de la literatura.

En el cas d'un model de bioassimilació modelitzat usant un model langmuirià d'adsorció,

9. S'ha obtingut una expressió aproximada per determinar la concentració de metall a la superfície de la cèl·lula, de la que poden obtenir-se expressions per als fluxos. Aquesta expressió també permet estimar el temps necessari per que el sistema assoleixi el 95% (o qualsevol altre percentatge) de l'estat estacionari, i per tant, de la durada que ha de tenir el procés per tal que siguin vàlides les informacions extretes de suposar règims estacionaris.

- 
10. S'ha demostrat que el règim transitori té notable influència en les quantitats acumulades.
  11. L'ús del mètode ISSA per recuperar el conjunt complet de paràmetres del model a partir de la informació de la càrrega total en el règim estacionari es mostra insuficient degut a l'elevat nombre d'incògnites del sistema.
  12. L'estratègia ISSA acompanyada de la informació addicional subministrada per un mètode d'extracció permet obtenir els paràmetres del sistema quan la constant d'internalització és baixa. Quan aquesta constant pren valors grans o quan el radi de l'organisme és gran (es triga molt en arribar a l'estat estacionari) l'estratègia ISSA simple perd precisió i pot conduir a valors erronis de les constants. Ara bé, tenir dades del període transitori i la reinterpretació de l'ordenada a l'origen de la regressió lineal (ISSA refinat) permet, en aquestes circumstàncies, obtenir el valor correcte dels paràmetres del sistema per l'aplicació iterativa de la metodologia anterior.

Pel que fa a l'estudi dels canals iònics:

13. Els corrents en un elèctrode de mercuri recobert d'una monocapa lipídica modificada amb canals iònics, en una solució que contingui un ió metàl·lic electroactiu que pugui permear a través d'ella, es poden simular com un procés de difusió des del si de la solució seguit d'un procés d'internalització a través d'una disposició de canals iònics inserits en la membrana lipídica. La introducció de la permeabilitat local com a relació entre la concentració a la superfície de la membrana i el gradient a la monocapa, ens permet desacoblar processos.

14. El model ens permet predir els corrents a partir de la suposició d'una determinada expressió de la permeabilitat local  $P(t)$ . A la inversa, també permet, a partir dels valors experimentals dels corrents, i usant tècniques de semiintegració, determinar una funcionalitat per  $P(t)$ .
15. Les dades experimentals de la reducció de  $Tl^+$  sobre un elèctrode recobert d'una monocapa lipídica modificada amb canals de gramicidina mostren un decaïment exponencial de  $P(t)$ . Aquest comportament suggereix un model específic per la permeabilitat (model EDP) que estableix que la conducció és controlada per la interconversió entre dues formes, una conductora i l'altra no, de la gramicidina, seguida per un procés cinètic heterogeni de primer ordre.
16. La raonable dependència lineal dels corrents experimentals (sobre tot a temps prou llargs) amb la concentració de  $Tl^+$  abona la validesa del model EDP (si més no, com aproximació de primer ordre). L'expressió que resulta per la permeabilitat implica només tres paràmetres  $P_\infty$ ,  $P_\Delta$ , i  $k_\Sigma$ , sent el primer el més robust dels tres.
17. La consideració d'un procés reversible per a l'etapa de la hidratació permet un ajust millorat de les dades i un millor processat dels fluxos a potencials no necessàriament corresponents a les condicions limitades per difusió. Aquesta implementació porta a un model EDP refinat, que inclou un nou paràmetre en la funcionalitat de  $P(t)$  respecte el model EDP simple. El nou paràmetre  $k_3$  segueix una dependència quasi nernstiana amb el potencial a potencials més positius d'aquells característics de les condicions limitades per difusió.
18. L'ús d'additius que tenen una estructura molecular que pot interactuar amb els residus de triptòfan de la gramicidina, modifiquen la permeabilitat dels canals. L'addició de *all trans* retinol o benzo- $\alpha$ -pirè a la monocapa ralentitza el

---

decaïment de la permeabilitat i incrementa la intensitat de corrent comparat amb la monocapa sense additiu. El primer compost és més efectiu que el benzo- $\alpha$ -pirè en estabilitzar els canals actius. L'augment de concentració d'additiu té fa augmentar  $P_{\infty}$  i disminuir  $k_{\Sigma}$ , però aquesta variació no és lineal.

19. Els corrents i la permeabilitat creixen quan els potencials passen de -0.35 a -0.5 V. A potencials més negatius les dues magnituds decreixen, el que podria suggerir una disminució de l'estabilitat dels canals a aquests potencials, o bé, una competència del  $Tl^{+}$  amb altres cations ( $K^{+}$ ), o altres efectes conformacionals que puguin aparèixer a aquests potencials.
20. Els paràmetres concrets de  $P(t)$  es veuen poc afectats pel valor del potencial, excepte  $k_3$ , que mostra un comportament quasi-nernstià a potencials més positius de -0.5 V mentre que a potencials més negatius pràcticament no varia.