



UNIVERSIDAD DE BURGOS

ÁREA DE QUÍMICA ANALÍTICA

DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

**ESPECTROELECTROQUÍMICA UV-VIS CON
ELECTRODOS SERIGRAFIADOS. ESTUDIO Y
DETERMINACIÓN DE NEUROTRANSMISORES.**

Memoria presentada por

NOELIA GONZÁLEZ DIÉGUEZ

Para optar al título de Doctor por la Universidad de Burgos

Directores:

Dra. M^a Aránzazu Heras Vidaurre

Dr. Álvaro Colina Santamaría

Burgos, Mayo 2017



DEPARTAMENTO DE QUÍMICA

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE BURGOS

Dña. M^a ARÁNZAZU HERAS VIDAURRE,

Profesora Titular del Área de Química Analítica de la Universidad de Burgos

y

D. ÁLVARO COLINA SANTAMARÍA,

Profesor Titular del Área de Química Analítica de la Universidad de Burgos

Hacen constar:

Que la presente memoria resume el trabajo titulado **“ESPECTROELECTROQUÍMICA UV-VIS CON ELECTRODOS SERIGRAFIADOS. ESTUDIO Y DETERMINACIÓN DE NEUROTRANSMISORES”** realizado por Dña. Noelia González Diéguez en el Área de Química Analítica y bajo nuestra dirección para optar al grado de Doctor por la Universidad de Burgos.

Manifestamos nuestra conformidad con el contenido de la memoria y autorizamos su presentación para ser defendida como Tesis Doctoral.

Burgos, 30 de mayo de 2017.

Fdo: M^a Aránzazu Heras Vidaurre

Fdo: Álvaro Colina Santamaría

A mis padres y a Diego

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos

Y por fin lo conseguimos...ya casi ni lo creíamos, pero sí, finalmente llegó el momento de defender mi Tesis Doctoral, y el camino que hemos seguido hasta aquí no ha sido fácil...

Hablo en plural, porque esta Tesis no es sólo mía...comparto un pedacito de ella con mucha gente que a lo largo de todos estos años ha estado a mi lado de forma incondicional, apoyándome en los malos y buenos momentos.

Como no puede ser de otra manera, he de empezar dando las gracias a mi familia y en concreto a mis padres....qué hubiera sido de mí sin vosotros! Me habéis guiado en todo momento, me habéis enseñado a superar las barreras que en ciertos momentos te pone la vida, enseñanzas que me han hecho ser quién soy, y llegar hasta donde he llegado. Vuestro apoyo, cariño y protección siempre ha sido pieza fundamental en todos mis proyectos, tanto profesionales como personales, no tengo forma de agradeceros tanto esfuerzo y tanta ayuda sin que nunca me hayáis pedido nada a cambio, por eso, sólo os puedo intentar devolver vuestro apoyo superándome a mí misma y a todo obstáculo que se ponga en mi camino, ya que así, podré haceros sentir orgullosos.

Otro agradecimiento desde lo más profundo de mi corazón es para mi novio, Diego, ya que, aunque ya son muchos años juntos y mucho trayecto recorrido, más de uno diría que llevamos toda la vida unidos....y en cierta forma así es, por ello me siento enormemente orgullosa, porque siempre estás ahí, cuando caigo me levantas, cuando me nublo me das visibilidad, cuando estoy triste, tú eres mi ánimo...y así podría seguir páginas y páginas porque sólo tengo palabras de agradecimiento, las cuales por mucho que expresen no pueden llegar a representar lo afortunada que soy de tenerte.

Llegar hasta aquí nunca hubiera sido lo mismo sin mis químicos preferidos, David (poyete), Dani, Leti, Miri, Nere y Rizos (que aunque no es químico le aceptamos como tal), Tan divertido ha sido el sendero de la ciencia con vosotros que creo, bueno, estoy segura, que elegir esta carrera fue una de las mejores a la par que importantes decisiones de mi vida. Con vosotros he ganado una amistad

increíble y un apoyo a todos los niveles, que hoy sigue igual de vivo que aquellos primeros días de universitarios...Quiero hacer mención especial, si me lo permitís el resto, a Poyete y Dani, puesto que su compañía, ayuda, apoyo, alegría, etc...han sido fundamentales desde el primer segundo en el que me embarqué en esta aventura doctoral, de manera, que gracias, de verdad, sin vuestro ánimo esto no habría salido adelante.

A este respecto, no puedo dejar de nombrar a Jesús, Bego, Julia, Lorena, Wil...juntos nos hemos convertido en doctores, compartiendo días mejores y días peores, así que chicos, es de ley decir que nos lo hemos ganado con nuestro esfuerzo y trabajo en equipo, nos debemos un enhorabuena!

Y siendo algo más rigurosa, por supuesto agradecer la disponibilidad y apoyo al grupo de Análisis Instrumental, a mi directora Arancha, por su esfuerzo, al “jefe” Álvaro y al “jefe emérito” y su gran mujer, Jesús y Trini.

Parte importante de este recorrido han sido mis amigas, Taniha, Angie, Bea, Ali, Epi y Leyre, sin vosotras mi vida, en general, no sería la misma, de hecho me hubiera perdido mucho, entre otras cosas un lugar donde reír a carcajadas, un pañuelo donde llorar, un pilar donde aguantar....de verdad chicas, sois las mejores, aunque suene tópico, después de 28 años...tenéis que saberlo y creerlo. Mención especial me gustaría hacerle a Taniha, que es como la hermana que nunca tuve, si me faltaras perdería parte de mí misma.

Finalmente, no quiero dejar de agradecer su ánimo y cariño a mis amigos del pueblo, que son muchos, pero especialmente a Sara, Bea, Rodri, Elena, Cris , mi cuñado Alex.. juntos hemos disfrutado, nos hemos cabreado, hemos reído, llorado, y de todo hemos salido ganando y reforzados, nos veamos más o menos, siempre hay una palabra en la distancia que se preocupa por ti, y en ciertos momentos, vale más que cualquier otra cosa. Gracias jóvenes espinosiegos!

Resumiendo, muchísimas gracias a todos vosotros, los que estáis conmigo y los que por desgracia ya no lo estáis, no hubiera logrado esta meta sin vosotros y tampoco sería la Nola!

ÍNDICE

Índice

Agradecimientos	7
ÍNDICE	11
INTRODUCCIÓN	17
1. FUNDAMENTO TEÓRICO.....	23
1.1 Fundamentos de espectroelectroquímica.....	25
1.1.1 Introducción	25
1.1.2 Espectroelectroquímica de absorción en el UV/Visible	27
1.1.3 Espectroelectroquímica de reflexión en el UV/Visible	32
1.2 Electroodos serigrafiados	34
1.3 Neurotransmisores y aminoácidos.....	36
1.3.1 Dopamina	36
1.3.1.1 Mecanismo de oxidación de la dopamina.....	39
1.3.2 Adrenalina.....	42
1.3.2.1 Mecanismo de oxidación de la adrenalina.....	43
1.3.3 L-Dopa	46
1.3.3.1 Mecanismo de oxidación de la L-Dopa.....	47
1.3.4 Catecol.....	50
1.3.4.1 Mecanismo de oxidación del catecol	51
2. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DEL DISPOSITIVO ESPECTROELECTROQUÍMICO	53
2.1 Introducción	55

2.2	Reactivos	57
2.3	Equipo electroquímico	57
2.4	Equipo espectrofotométrico	59
2.5	Dispositivo espectroelectroquímico	61
2.5.1	Electrodos serigrafiados	61
2.5.2	Dispositivo espectroelectroquímico básico	63
2.5.3	Celda espectroelectroquímica para electrodos serigrafiados	64
2.5.4	Dispositivo espectroelectroquímico	66
2.6	Validación de la celda espectroelectroquímica	67
2.6.1.1	Oxidación de ferrocianuro	67
2.6.1.2	Complejo de rutenio tris(2,2'-bipiridina), Ru(bpy)	69
2.6.1.3	Carmín de índigo	71
2.6.1.4	o-Tolidina	75
2.7	Adquisición y tratamiento de datos	78
3.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	85
3.1	Estudio espectroelectroquímico de DOPAMINA	87
3.1.1	Espectroelectroquímica de la electro-oxidación de dopamina.	87
3.1.2	Determinación espectroelectroquímica de dopamina	97
3.2	Estudio espectroelectroquímico de adrenalina	109
3.2.1	Espectroelectroquímica de la electro-oxidación de adrenalina	109
3.2.2	Determinación espectroelectroquímica de adrenalina	119
3.3	Estudio espectroelectroquímico de l-dopa	127
3.3.1	Espectroelectroquímica de la electrooxidación de L-dopa.	127

3.3.2	Determinación espectroelectroquímica de L-dopa.	137
3.4	Resolución espectroelectroquímica de mezclas.....	145
3.4.1	Mezclas de dopamina y l-dopa	146
3.4.2	Mezclas de dopamina y catecol.....	153
4.	CONCLUSIONES.....	161
5.	ANEXOS	165
6.	BIBLIOGRAFÍA	175

INTRODUCCIÓN

La Espectroelectroquímica es una técnica instrumental de respuesta múltiple en la que se combina una técnica electroquímica con una técnica espectroscópica proporcionando información simultánea y complementaria sobre un sistema químico en el que se perturba su equilibrio. Desde su invención por Kuwana hace más de 50 años, han sido muchos los artículos publicados sobre dispositivos y aplicaciones de esta técnica, habiéndose utilizado para el estudio de moléculas y materiales de muy diversa naturaleza. Los desarrollos tecnológicos han sido muy numerosos, pero sin embargo, en general, puede considerarse que tanto los dispositivos como el tratamiento de los resultados presentan una alta complejidad. Quizás sea esta la razón por la que existe una limitada aplicación de esta técnica en aplicaciones puramente analíticas. Sin lugar a dudas, la espectroelectroquímica es una técnica instrumental con grandes posibilidades analíticas. Son numerosos los mecanismos de reacción elucidados gracias a la espectroelectroquímica, del mismo modo, las aplicaciones en la caracterización de materiales ilustran la potencialidad de esta técnica. Incluso se ha utilizado para la obtención de parámetros químico-físicos característicos de las moléculas que difícilmente son obtenidos mediante otras técnicas, y sin embargo, la Química Analítica todavía no ha aprovechado las bondades de esta técnica de respuesta múltiple. Como se indica en uno de los artículos más citados sobre espectroelectroquímica, esta técnica recoge lo mejor de dos mundos diferentes, que además son complementarios. Tanto la electroquímica como la espectrofotometría de absorción molecular en el UV/Vis, por sí mismas, presentan una alta limitación en la selectividad de los análisis. Particularmente, la electroquímica carece de la especificidad molecular suficiente para resolver mezclas complejas, que unida al alto grado de solapamiento de señales en moléculas de naturaleza similar, limita sus aplicaciones a no ser que se combine con una técnica de separación. Sin embargo, presenta la ventaja de perturbar fácilmente los sistemas químicos, poseyendo una propiedad que no se suele tener en cuenta a la hora de realizar análisis químico y que consiste en que la medida se realiza en condiciones alejadas del equilibrio. Por lo tanto podemos afirmar que es una técnica intrínsecamente dinámica. Del mismo modo, la espectrofotometría de absorción molecular, aunque contiene información molecular, el alto solapamiento de bandas no permite separar las señales analíticas de modo sencillo. Por ello, en numerosas ocasiones, al igual que la electroquímica, se combina también con técnicas de separación. Sin embargo, muchos compuestos que no presentan bandas

características en el espectro visible en alguna de sus formas redox, sí que dan lugar a cambios espectrales cuando son oxidadas o reducidas. La espectrofotometría que suele ser una técnica en la que se mide en el equilibrio, se aprovecha de la naturaleza dinámica de la electroquímica. Y la electroquímica se aprovecha de la información molecular de la espectrofotometría. Es prácticamente imposible que dos compuestos químicos se oxiden y reduzcan al mismo potencial y que a su vez tengan el mismo espectro. Por ello, y aprovechando las herramientas matemáticas existentes en la actualidad, hacen que la espectroelectroquímica sea una técnica con una alta potencialidad en el análisis químico con un futuro prometedor, permitiendo resolver mezclas realmente complejas de moléculas de alto interés, sin necesidad de ser acoplada con una técnica de separación, como se demuestra a lo largo de esa Tesis Doctoral. El principal objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de nuevas metodologías que permitan una fácil obtención y tratamiento de datos espectroelectroquímicos con alta reproducibilidad. Para ello se ha decidido trabajar con electrodos serigrafiados de carbono que permiten obtener medidas analíticas con el mismo estado superficial del electrodo de trabajo, lo que es fundamental para conseguir medias espectroscópicas reproducibles, facilitando a la vez el posicionamiento del sistema óptico de iluminación y de recolección de la luz. Asimismo, y simultáneamente a los desarrollos tecnológicos, también se ha realizado una selección de sistemas químicos que ilustren las capacidades analíticas de la espectroelectroquímica de absorción molecular en el Ultravioleta/Visible. En concreto, los neurotransmisores son sustancias de alto interés químico y biológico que presentan una electroquímica y una espectroscopía muy similar, lo que les convierte en moléculas ideales para demostrar la potencialidad de la espectroelectroquímica.

La presente Tesis Doctoral está centrada en la determinación de neurotransmisores utilizando espectroelectroquímica de absorción en el Ultravioleta/Visible. En el capítulo 1 de la memoria se realiza una introducción a los aspectos fundamentales tanto de la espectroelectroquímica como de los neurotransmisores que van a ser estudiados. A continuación en el capítulo 2 se describen los equipos y los dispositivos espectroelectroquímicos utilizados, mostrándose experimentos con moléculas habitualmente utilizadas para demostrar su correcto funcionamiento. Particularmente relevante es el desarrollo de una nueva celda

espectroelectroquímica para electrodos serigrafiados que en estos momentos está siendo comercializada por la empresa Dropsens S.L. En los resultados y discusión se pueden distinguir cuatro partes fundamentales. Inicialmente se describe el comportamiento y determinación de los neurotransmisores elegidos: dopamina, adrenalina y L-dopa, que son analizados individualmente con el fin de comprender su mecanismo de reacción y sus características analíticas, demostrando la gran capacidad de la espectroelectroquímica no solo para “ver” lo que ocurre en el proceso electródico, sino que también se obtienen señales de gran calidad analítica. Una de las claras ventajas de la espectroelectroquímica en análisis, es la intrínseca capacidad de esta técnica para conocer los mecanismos de reacción de las moléculas en el proceso electródico, lo que permite seleccionar las condiciones óptimas para llevar a cabo la determinación, comprendiendo en todo momento el comportamiento de los analitos. En muchas ocasiones, el análisis electroquímico conduce a métodos ciegos, que son una verdadera caja negra, en la que sabemos que nuestra señal es dependiente de la concentración de analito, pero no tenemos clara cual son las razones que mejoran o empeoran nuestro método analítico, e incluso por qué en determinadas ocasiones no funciona. Por otro lado, la cuantificación se ha planteado a lo largo de la Tesis Doctoral como una muestra de las diferentes posibilidades matemáticas que permite un conjunto de datos tan grande. Así, se han utilizado métodos univariantes basados en la corriente, absorbancia y derivada de la absorbancia, así como métodos multivariantes basados en *Partial Least Squares* y *Parallel Factor Analysis*. Este conjunto de resultados ilustra la potencialidad de la técnica, así como la versatilidad de la espectroelectroquímica dependiendo del problema estudiado. Es en la cuarta parte de los resultados y discusión donde se demuestra la mayor potencialidad de la espectroelectroquímica en análisis cuantitativo ya que se aborda la determinación de mezclas realmente complejas, con un alto nivel de interferencia. En concreto se estudian mezclas de dopamina con L-dopa y de dopamina con catecol, obteniendo muy buenos resultados desde el punto de vista cuantitativo. Finalmente en el último capítulo se recogen las conclusiones fundamentales de este trabajo.

1. FUNDAMENTO TEÓRICO

1. *Fundamento teórico*

1.1 FUNDAMENTOS DE ESPECTROELECTROQUÍMICA

1.1.1 INTRODUCCIÓN

La espectroelectroquímica es una técnica analítica que permite registrar de forma simultánea dos señales con información muy diferente relacionada con un mismo proceso electródico. Estas dos señales son, por una parte la electroquímica y por otra parte la espectroscópica.

El uso de técnicas electroquímicas acopladas a técnicas espectrofotométricas de absorción, emisión o reflexión, en las regiones espectrales del ultravioleta, visible e infrarrojo cercano, permite obtener información muy útil sobre las transiciones electrónicas de los reactivos, productos y/o intermedios de reacción durante una determinada reacción electródica. Esta información se consigue registrando los espectros de absorción, emisión o reflexión mientras se electrolizan las especies contenidas en la capa de disolución adyacente al electrodo de trabajo.

Entre las principales ventajas que presentan las técnicas espectroelectroquímicas se encuentran la posibilidad de monitorizar e identificar especies inestables o intermedios de reacción que aparecen durante el proceso de electrólisis, o la capacidad de realizar estudios dinámicos sobre los procesos analizados.

A mediados del siglo XX T. Kuwana propuso por primera vez la posibilidad de, trabajando con un electrodo ópticamente transparente, registrar los espectros de determinadas especies electroactivas y absorbentes de radiación UV/Visible durante su electrolisis [1]. Desde entonces han sido muchos los grupos que han utilizado estas técnicas aplicándolos a todo tipo de sistemas, desde analitos de interés biológico, a polímeros conductores o complejos metálicos, pasando por materiales de interés en nanotecnología como nanopartículas metálicas o nanoestructuras de carbono [2–26].

La espectroelectroquímica como técnica combinada permite la utilización simultánea de prácticamente cualquier técnica espectroscópica y electroquímica, combinación que finalmente dependerá del objetivo del estudio a llevar a cabo. Por ejemplo, en análisis cuantitativo las técnicas espectroelectroquímicas de absorción en

1. Fundamento teórico

el UV/Visible son las más adecuadas, siempre que las especies sean electroactivas y absorban radiación en esta región espectral [15,16,27–31]. Si el objetivo de la técnica es obtener información estructural del sistema bajo estudio, entonces lo más adecuado es utilizar técnicas específicas como la absorción o reflexión en el Infrarrojo [9,11,13,32–36], Resonancia Magnética Nuclear (RMN) [4,37–41] o la Espectroscopía Raman [25,34,42–51]. Si además de la información estructural, se sospecha que pueden existir radicales en el medio de trabajo lo más aconsejable es aplicar la resonancia de spin electrónico (RSE) [2,35,52–56].

En la Tabla 1 se muestra una comparación entre estas técnicas espectroelectroquímicas que registran *in situ* los cambios ocurridos en el medio de reacción:

Tabla 1. Comparación de técnicas espectroelectroquímicas (SEC) *in-situ* [57].

TÉCNICA	SENSIBILIDAD	INFORMACIÓN ESTRUCTURAL	SELECTIVIDAD	TIEMPO DE RESOLUCIÓN
SEC UV-Vis (OTTLE/OTE)	buena	muy pobre	muy pobre	buena
SEC REFLEXIÓN UV-Vis	buena	muy pobre	muy pobre	buena
SEC RMN	muy pobre	buena	muy pobre	muy pobre
SEC RSE	excelente para radicales	buena	pobre	buena
SEC IR	buena	muy buena	muy pobre	muy pobre
SEC RAMAN	pobre	muy buena	pobre	buena
SEC RAMAN SERS	excelente	muy buena	excelente	buena
ELIPSOMETRÍA	excelente	pobre	buena	buena

En cuanto a las técnicas electroquímicas habitualmente utilizadas para combinar con las espectroscópicas anteriormente mencionadas, cabe destacar dos de ellas, la cronoamperometría y la voltamperometría, usadas de forma masiva.

La cronoamperometría [58,59] consiste en analizar la evolución temporal de la intensidad de corriente al aplicar un potencial fijo al sistema, potencial en el cual tiene lugar la reacción electroquímica. En la voltamperometría [58,59], sin embargo, se aplica una rampa de potenciales en un rango en el se produce la transferencia electrónica registrándose el valor de intensidad de corriente en cada uno de los valores de potencial aplicados.

Menos utilizadas son las técnicas cronopotenciométricas [58,59], en las cuales se registran las variaciones de potencial al aplicar un valor constante de intensidad de corriente o las técnicas de pulsos [58,59], extremadamente útiles para la determinación cuantitativa de especies orgánicas e inorgánicas ya que implican una notable mejora de la relación corriente faradaica/no faradaica. Por último indicar, que ocasionalmente se utilizan técnicas voltamperométricas de redisolución con fines cuantitativos acopladas a la espectroscopía [58,59] donde se deposita un analito sobre la superficie del electrodo, el cual se detectará al producirse su redisolución durante un barrido de potencial adecuado.

Por último mencionar la combinación de la microbalanza electroquímica de cristal de cuarzo (EQCM) con técnicas espectroelectroquímicas [60,61], a través de la cual se pueden correlacionar las reacciones ocurridas en la superficie del electrodo con los cambios de masa en la misma.

1.1.2 ESPECTROELECTROQUÍMICA DE ABSORCIÓN EN EL UV/VISIBLE

En este trabajo se van a presentar los resultados experimentales obtenidos mediante medidas espectroelectroquímicas basadas en la absorción de radiación electromagnética por parte de los analitos estudiados, cuando dicho haz de luz es reflejado sobre la superficie del electrodo. A continuación se explican las bases teóricas de las técnicas espectroelectroquímicas de absorción en la región UV/Visible del espectro electromagnético, que ayudarán a comprender el método de trabajo utilizado así como el análisis de los resultados obtenidos.

En una experiencia espectroelectroquímica de absorción en el UV/Vis, las variaciones de la luz absorbida por un sistema químico pueden ser registradas en función de:

1. Fundamento teórico

- ✓ la longitud de onda a una diferencia de potencial determinada, denominado ESPECTRO DE ABSORCIÓN.
- ✓ el potencial aplicado o el tiempo a una longitud de onda determinada, denominado VOLTABSORCIOGRAMA.

Por otro lado se dispondrá siempre de la señal electroquímica, que en este trabajo será en todos los casos voltamperogramas.

Los votabsorciogramas y voltamperogramas obtenidos son muy útiles para estudiar el mecanismo de oxidación y/o reducción de los analitos, es decir, ayudan a determinar el mecanismo de reacción del sistema objeto de estudio. Por otro lado, los espectros de absorción registrados a diferentes potenciales suministran gran cantidad de información que permiten caracterizar tanto los productos como los intermedios de reacción. En general, las técnicas espectroelectroquímicas de absorción en el UV/Vis ayudan a identificar el centro redox implicado en el proceso de transferencia electrónica y caracterizar los productos de la oxidación y/o reducción gracias a la doble información obtenida, electroquímica y espectroscópica.

Un problema que complica en muchas ocasiones la interpretación de experiencias puramente electroquímicas, como es la aparición de intermedios o productos secundarios de reacción, es simplificado con frecuencia al combinar estas dos técnicas, ya que es más sencillo obtener información directa sobre prácticamente toda especie generada y/o consumida durante la reacción sobre el electrodo de trabajo [15,62].

Tomando como base la difusión de las especies desde y hacia la superficie del electrodo donde ocurre el proceso de transferencia electrónica, se puede hablar de dos métodos de trabajo diferentes según se limite o no el espacio en el que estas especies difunden:

- ✓ RÉGIMEN DE DIFUSIÓN SEMI-INFINITA: no existe ninguna restricción en el espacio en el cual pueden difundir las especies generadas durante la reacción electródica [6,16,31,35,52,63–68].

- ✓ RÉGIMEN DE DIFUSIÓN EN CAPA FINA: el espacio en el cual difunden las especies electroactivas queda confinado a una estrecha capa delimitada por dos paredes paralelas y enfrentadas. Una de ellas es el electrodo de trabajo, mientras que la otra puede ser una pared inerte u otro electrodo de trabajo gemelo al anterior. En este modo de trabajo, las especies quedan electrolizadas completamente en un corto espacio tiempo, dependiendo siempre del espesor de la capa fina, lo cual supone una ventaja para determinadas aplicaciones [12,13,29,33,62,66,68–72].

Genéricamente una celda electroquímica consta de tres electrodos, el electrodo de trabajo en el cual ocurre la reacción electródica, el electrodo de referencia frente al que se mide el potencial aplicado al de trabajo, y el contraelectrodo. Para que esta celda se convierta en una celda espectroelectroquímica, debe hacerse pasar un haz de luz (de la naturaleza deseada) con el objetivo de estudiar las especies electroactivas consumidas, generadas y/o adsorbidas sobre la superficie electródica. Según el modo de incidencia del haz de radiación en el electrodo de trabajo las celdas espectroelectroquímicas y, por lo tanto, las medidas espectroelectroquímicas, se pueden clasificar en tres grupos generales:

- ✓ CELDAS DE TRANSMISIÓN NORMAL (Figura 1.a): el haz de radiación incide perpendicularmente a la superficie del electrodo de trabajo, siendo imprescindible que éste sea ópticamente transparente.
- ✓ CELDAS DE REFLEXIÓN: el haz de radiación es reflejado sobre la superficie del electrodo antes de llegar al detector. Existen dos modos básicos de realizar medidas de reflexión. La primera es la denominada de REFLEXIÓN ESPECULAR, donde el haz de radiación es reflejado sobre la superficie metálica del electrodo de trabajo pasando a través de la disolución antes y después de la reflexión (Figura 1.b). El segundo tipo son las llamadas de REFLEXIÓN INTERNA (Figura 1.c), en las que el haz de radiación incide por la parte anterior o trasera del electrodo ópticamente transparente con un ángulo superior al crítico de modo que es totalmente reflejado. Como consecuencia solo las moléculas situadas muy cerca de la superficie del electrodo pueden absorber parte de la luz incidente, lo que hace que se midan valores de absorbancia muy bajos. Para aumentar esta señal, se han diseñado celdas en las que el haz se refleja múltiples veces sobre el electrodo ópticamente transparente.

1. Fundamento teórico

- ✓ CELDAS DE CONFIGURACIÓN PARALELA (Figura 1.d): el haz de radiación incide paralelamente a la superficie del electrodo que debe ser perfectamente plana, siendo muy importante la alineación del haz de radiación con dicha superficie.

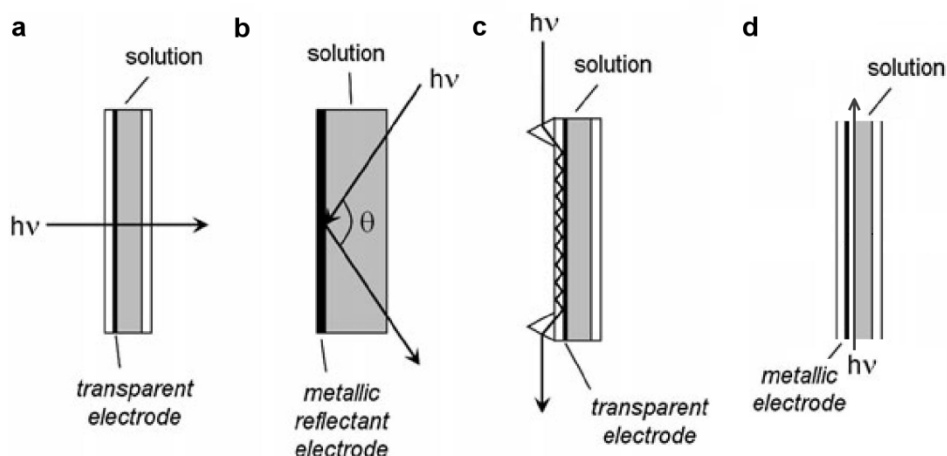


Figura 1. Esquemas de diferentes celdas espectroelectroquímicas en función del modo de incidencia de la radiación electromagnética sobre el electrodo de trabajo. (a) Celda de transmisión normal, (b) Celda de reflexión especular, (c) Celda de reflexión interna y (d) Celda de configuración paralela.[62]

Así, tal y como queda reflejado en la Figura 1, las medidas realizadas con celdas de transmisión normal y de reflexión interna tienen una particularidad, los electrodos deben de ser ópticamente transparentes y conductores de la electricidad. Conseguir que un electrodo tenga una alta transparencia y además sea muy conductor no siempre es sencillo, por lo que habitualmente se tiene que llegar a soluciones de compromiso. Las alternativas más comunes para este tipo de electrodos son las siguientes:

- ✓ MINIREJILLAS DE FINOS HILOS METÁLICOS, generalmente oro o platino, que agrupan cientos de hilos por centímetro, y las aberturas presentes les confieren su transparencia [62,69,73–75].
- ✓ PELÍCULAS FINAS de metales como oro o platino, de materiales semiconductores como el óxido de indio y estaño (ITO), o de materiales nanoestructurados de carbono como nanotubos de carbono o grafeno, depositadas sobre vidrio, cuarzo o un sustrato polimérico que sea transparente a la radiación en la región espectral estudiada [6,13,20,32,62,67,69,73,76].

Desde este punto de vista, uno de los dispositivos más utilizados y que más información ha suministrado sobre multitud de sistemas son las celdas con electrodos ópticamente transparente de capa fina (OTTLE). Existen muchas variantes de la primera celda de estas características propuesta por Heineman y colaboradores en 1971 [75].

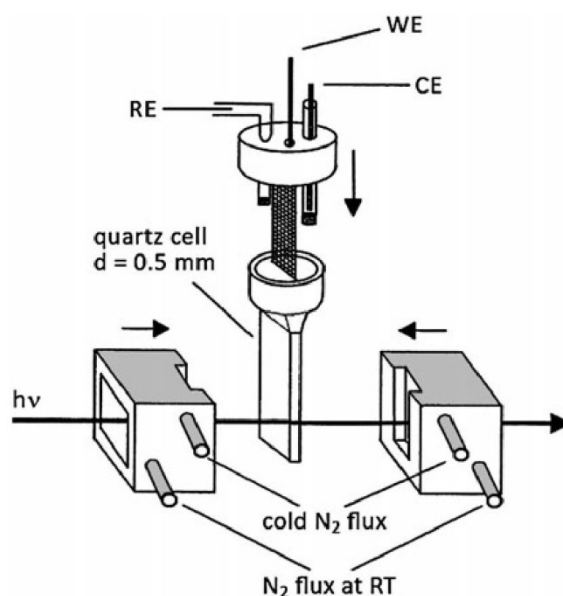


Figura 2. Representación esquemática de una celda OTTLE de transmisión a temperatura controlada. [62]

La Figura 2 muestra un ejemplo de celda OTTLE [62] donde el electrodo ópticamente transparente es una malla de platino-rodio. El diseño permite una buena reproducibilidad en la posición de los electrodos y que el volumen a analizar sea muy pequeño. Además es posible realizar experiencias a temperatura controlada, una variable muy importante en toda reacción electroquímica. El mayor problema de este diseño es la gran caída óhmica de las señales registradas.

Con el objetivo de disminuir el efecto de la caída óhmica se han propuesto diferentes soluciones. Una de ellas es trabajar con una celda de capa fina con estructura tipo sándwich como las mostradas en la Figura 3 [72,74].

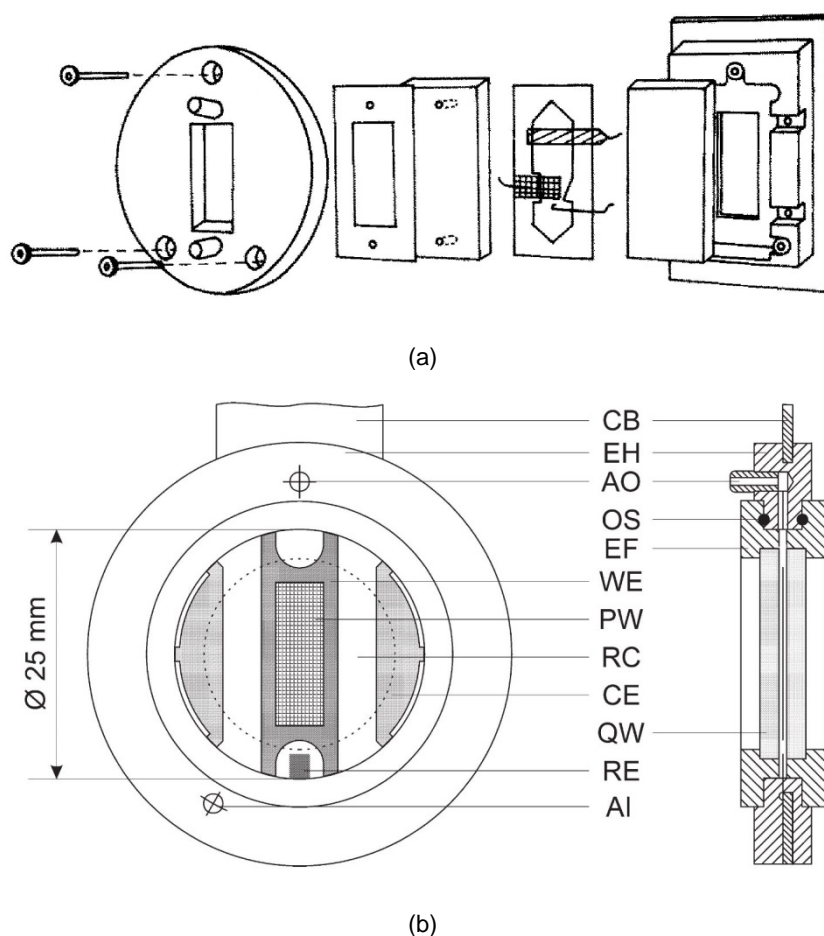


Figura 3. Representación esquemática de celdas OTTLE tipo sándwich (a) para medidas de transmisión en el infrarrojo [74] y en el UV-Vis [72].

1.1.3 ESPECTROELECTROQUÍMICA DE REFLEXIÓN EN EL UV/VISIBLE

Los estudios realizados en este trabajo se han llevado a cabo utilizando la técnica espectroelectroquímica de reflexión especular de incidencia normal, permitiendo realizar no solo estudios de mecanismo de reacción sino también obtener información cuantitativa y cualitativa de los sistemas biológicos objeto de estudio.

Como se ha comentado anteriormente, en la reflexión especular un haz de radiación incide sobre la superficie del electrodo, siendo parcialmente reflejada y absorbida (Figura 4). Dependiendo de las condiciones de trabajo y del sistema objeto de estudio, esta técnica puede proporcionar información tanto sobre especies

generadas y/o consumidas durante la reacción electródica presentes en la disolución adyacente a la superficie del electrodo de trabajo como sobre homogeneidad y espesor de una película depositada sobre el citado electrodo.

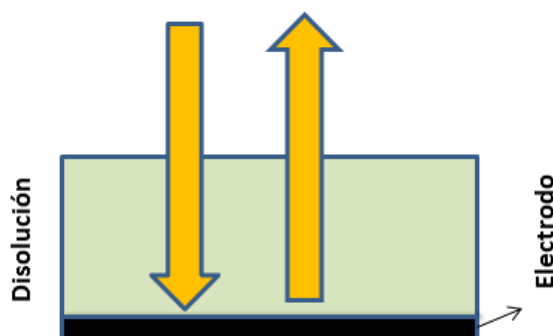


Figura 4. Esquema del modo de medida en la técnica espectroelectroquímica reflexión de incidencia normal.

Dentro de las diferentes configuraciones de trabajo que se pueden utilizar para trabajar en espectroelectroquímica de reflexión en este trabajo se ha hecho uso de la denominada espectroelectroquímica de reflexión de incidencia casi normal (NNIRS) propuesta por Pyun y Park [77] (Figura 5). Este tipo de medidas se consiguen utilizando una sonda de fibra óptica de reflexión colocada perpendicular y muy cerca de la superficie del electrodo de trabajo que ha de ser reflectante, sonda de reflexión que es capaz de conducir la radiación procedente de la fuente hasta la superficie del electrodo y la disolución adyacente a él, y desde éste hasta el detector. Con este tipo de dispositivo se puede realizar tanto estudios sobre las especies presentes en la disolución como para películas adsorbidas sobre el electrodo de trabajo.

Esta configuración es simple y muy versátil para medidas en difusión semi-infinita y películas finas [65]. El principal requisito es que el electrodo de trabajo sea de un material altamente pulido para que la luz procedente de la fibra óptica pueda reflejarse correctamente bajo las condiciones adecuadas.

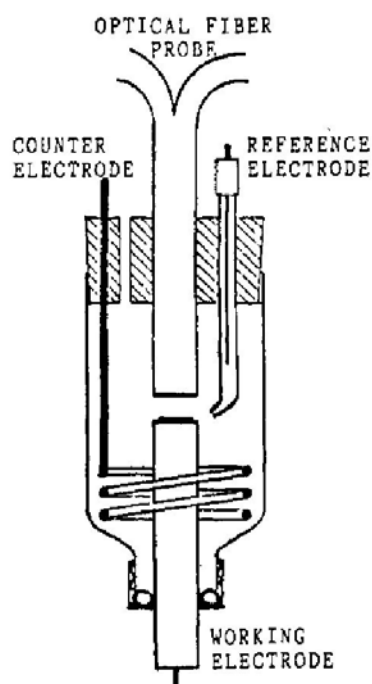


Figura 5. Diagrama esquemático de una celda utilizada en medidas NNIRS [77].

1.2 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

El desarrollo de nuevos sensores electroquímicos útiles para análisis rutinarios hace que los electrodos convencionales de oro, platino o carbono no sean muy útiles, ya que habitualmente tras una determinación quedan modificados, siendo necesaria su limpieza para recuperar el estado inicial del mismo, lo que alarga el análisis no haciendo los análisis muy reproducibles en algunos casos. Por otro lado, es cada vez más habitual trabajar con volúmenes de muestra muy reducidos, lo que supone adaptar las celdas electroquímicas convencionales para posibilitar el análisis de microvolúmenes.

En esta línea, los electrodos serigrafiados (SPE) se presentan como una solución que incluyen en un solo dispositivo el electrodo de referencia, el de trabajo y el contraelectrodo (Figura 6). La tecnología de serigrafado consiste en la fabricación de estos dispositivos con técnicas de impresión de tintas con diferentes características sobre sustratos aislantes de diferente naturaleza como plástico o cerámica [78–84]. Utilizando sucesivamente máscaras adecuadas se consigue depositar tanto los electrodos con la geometría deseada, como los contactos eléctricos de cada uno de

ellos. Las tintas más habituales son las que contienen plata o carbono, pero éstas pueden ser modificadas con otros materiales como enzimas, nanopartículas metálicas, nanotubos de carbono, polímeros o agentes complejantes, para mejorar la sensibilidad y/o selectividad del análisis en el que se vaya a utilizar el electrodo serigrafiado final.

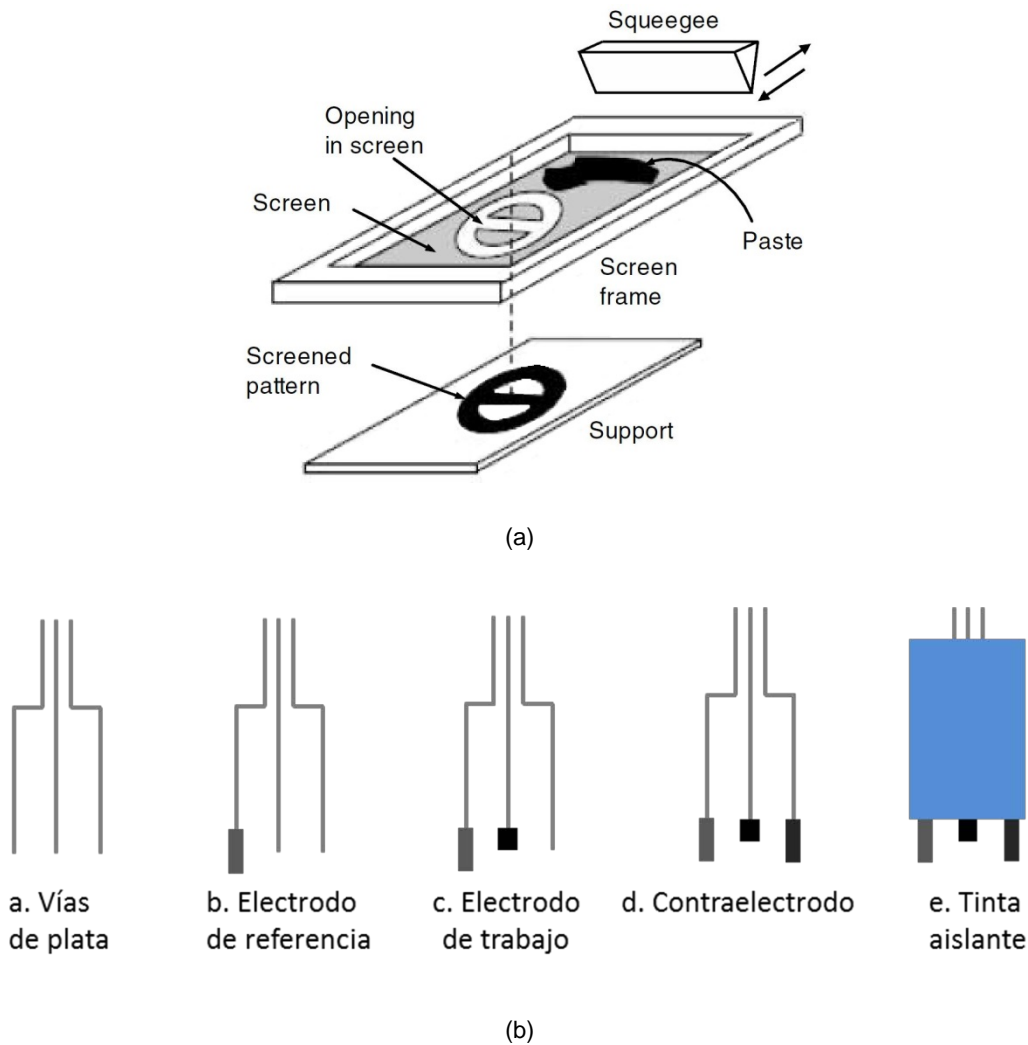


Figura 6. (a) Proceso de serigrafado [83]. (b) Etapas para fabricar un electrodo serigrafiado (SPE).

Entre las ventajas más destacables de los electrodos serigrafiados se encuentran su flexibilidad en el diseño de dichos electrodos, la automatización del proceso de fabricación, la buena reproducibilidad del proceso y de los electrodos obtenidos, así como la posibilidad de fabricarlos con un gran abanico de materiales. Esto último unido a las amplias vías de modificación a las que se puede someter la

superficie del electrodo de trabajo, como por ejemplo, enzimas, nanopartículas, polímeros les hace buenos candidatos en el campo del electroanálisis o la catálisis [85–98]. Así una de las vías más explotadas en la actualidad es su utilización como plataformas para construir diversos biosensores como son los enzimáticos, los inmunosensores o los genosensores [81,85,88–93,97,98].

Una de las desventajas que presentan estos electrodos son por una parte la reproducibilidad, cuestionada en muchas ocasiones, aunque los actuales desarrollos y medios de fabricación van solventando estos problemas. Por otro lado, la necesidad de utilizar tintas de impresión que suelen contener algunos aglutinantes minerales o polímeros aislantes que mejoran la adherencia sobre el sustrato [99] hace que aumente la resistencia de los electrodos serigrafiados, lo que se traduce en unas cinéticas más lentas de las registradas por ejemplo en electrodos de carbono vítreo. Se han descrito procedimientos en los que se ha sometido a electrodos de carbono a un tratamiento previo con mejoras significativas en cuanto a los procesos de transferencia electrónica en los que se han utilizado posteriormente [100–109].

Siguiendo esta línea se han desarrollado diferentes métodos de tratamiento superficial para mejorar las propiedades electroquímicas de SPEs que han llamado mucho la atención [110–112]. Así, el objetivo principal del pretratamiento previo de SPEs es eliminar componentes orgánicos o contaminantes de la tinta, aumentar la rugosidad de la superficie o incrementar la funcionalidad del electrodo.

1.3 NEUROTRANSMISORES Y AMINOÁCIDOS

1.3.1 DOPAMINA

La dopamina (Figura 7) es un importante neurotransmisor del grupo de las catecolaminas que actúa de mensajero en el sistema nervioso central de los mamíferos. Participa en muchas funciones biológicas como son las cognitivas, locomoción, emocionales o de regulación del sistema endocrino. Diversos estudios indican que variaciones en los niveles de este neurotransmisor tienen una clara relación con desórdenes neurológicos, como la enfermedad de Parkinson y la esquizofrenia, jugando también un papel fundamental en el sistema periférico como

modulador o regulador en los sistemas renal, hormonal, gastrointestinal y cardiovascular. Por lo tanto, tiene mucha importancia el desarrollo de métodos adecuados para determinar dopamina que sean rápidos, sencillos y altamente sensibles y/o selectivos [113–116].

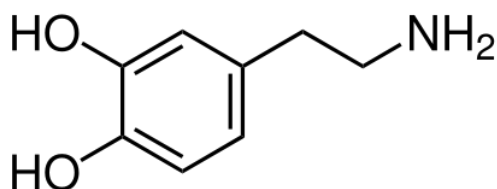


Figura 7. Estructura de la dopamina.

La dopamina tiene un espectro característico de absorción (Figura 8) con dos máximos situados en 220 y 280 nm relacionados con una transición $\pi \rightarrow \pi^*$ y $L_a \rightarrow L_b$, respectivamente, lo que hace factible su determinación espectrofotométrica en muestras in vitro [117,118].

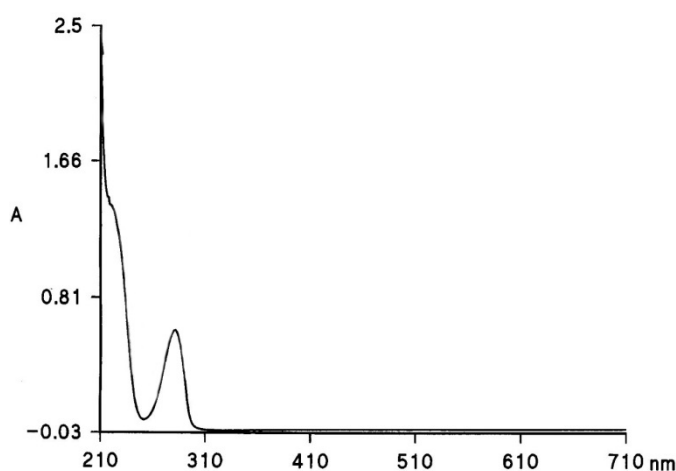


Figura 8. Espectro UV-Vis de dopamina en disolución acuosa [117].

Por otro lado, este neurotransmisor, al igual que otras catecolaminas, es fácilmente oxidable (Figura 9), por lo que los métodos electroquímicos resultan ser muy adecuados para su estudio y determinación [113,119–122].

Los análisis realizados con estas técnicas instrumentales clásicas dan muy buenos resultados para análisis in vitro, con muestras en ausencia de interferentes. Sin

embargo, cuando se quiere determinar dopamina en medios biológicos o se plantea su cuantificación in vivo, los resultados no suelen ser los más adecuados debido a las interferencias de muchos analitos habituales en dichos medios.

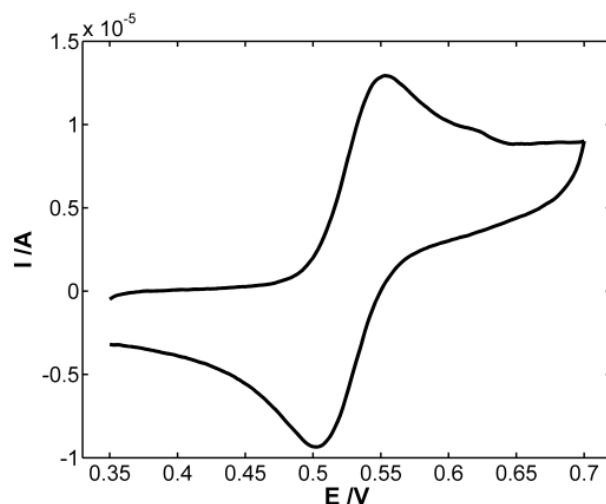


Figura 9. Voltamperograma cíclico de dopamina en disolución acuosa en medio ácido.

Entre ellos los más habituales son el ácido ascórbico, el ácido úrico y otros neurotransmisores como la L-dopa, la adrenalina o la serotonina, ya que se suelen oxidar a potenciales similares[120,123–125], y en algunas ocasiones presentan máximos de absorción en zonas cercanas a la de la dopamina [117,126–129].

Esto ha llevado a proponer multitud de métodos para llevar a cabo una determinación selectiva de dopamina en la que la interferencia de estos otros compuestos sea mínima. Así, se han propuesto multitud de electrodos modificados que permiten la determinación de dopamina en presencia de alguno de estos interferentes utilizando polímeros, enzimas, nanopartículas y/o nanoestructuras de carbono como nanotubos [119–122,124,136–140], Tabla 2. En otros casos las propuestas han sido a una separación de los analitos previa a su determinación electroquímica [141–145], espectroscópica [146,147] o con espectroscopia de masas [148–151], pero actualmente la línea más explotada es la detección electroquímica con o sin separación previa de los analitos.

Tabla 2. Modificaciones sobre electrodos de carbono para neurotransmisores.

TIPO DE ELECTRODO	MODIFICACIÓN	MEJORAS Y VENTAJAS	REFERENCIAS
ELECTRODO DE CARBONO	Nanotubos de carbono depositados sobre polímeros y ciclodextrinas	Aumento de la superficie activa del electrodo, aceleración de la transferencia electrónica	[121, 122, 124, 130–135, 136, 140]
ELECTRODO SERIGRAFIADO DE CARBONO	Nanotubos de carbono Grafeno	Eleva la estabilidad química y la conductividad electrónica. Óptima resolución electroquímica	[120][119]
ELECTRODO DE CARBONO VITRIFICADO	Polímeros	Mejoran la electrocatálisis. Evitan el ensuciamiento de la superficie electródica.	[76,101–105] [133,136]
	Surfactantes	Aumentan la sensibilidad y selectividad. Favorecen la reversibilidad del proceso..	[72,106]
	Zeolitas	Elevada definición, especificidad y selectividad.	[90,107]
ELECTRODO DE PASTA DE CARBONO	CAW/HNO ₃	Gran actividad catalítica biológica. Buena resolución y definición.	[82,108]
	Nanofibras de carbono	Reducción tiempo oxidación. Elevada sensibilidad.	[109]
	Nanotubos de carbono	Óptima resolución electroquímica.	[94,96–98,110] [133,134]

1.3.1.1 Mecanismo de oxidación de la dopamina.

La dopamina se oxida a través de un proceso bielectrónico hasta su forma quinoidea. En función del medio de reacción y otras variables experimentales, esta quinona puede sufrir posteriores reacciones químicas generando una especie polimérica adsorbida sobre el electrodo que implica la pérdida de actividad del mismo.

El primer producto de oxidación de la dopamina es la dopaminoquinona (DAQ), que es altamente inestable, y por un proceso de ciclación intramolecular vía adición 1,4-michael lleva a la generación del leucodopaminocromo (LDAC), producto fácilmente oxidable hasta dopaminocromo (DAC). El dopaminocromo, tras una reacción de isomerización, se transforma en un derivado del indol que por oxidación puede llegar a polimerizar. Este polímero no conductor, depositado sobre la superficie del electrodo, es el responsable de la pasivación del electrodo [125,152–156]. El mecanismo de oxidación de la dopamina es, por lo tanto, de tipo ECE (electroquímico-químico-electroquímico) tal y como se detalla en la Figura 10.

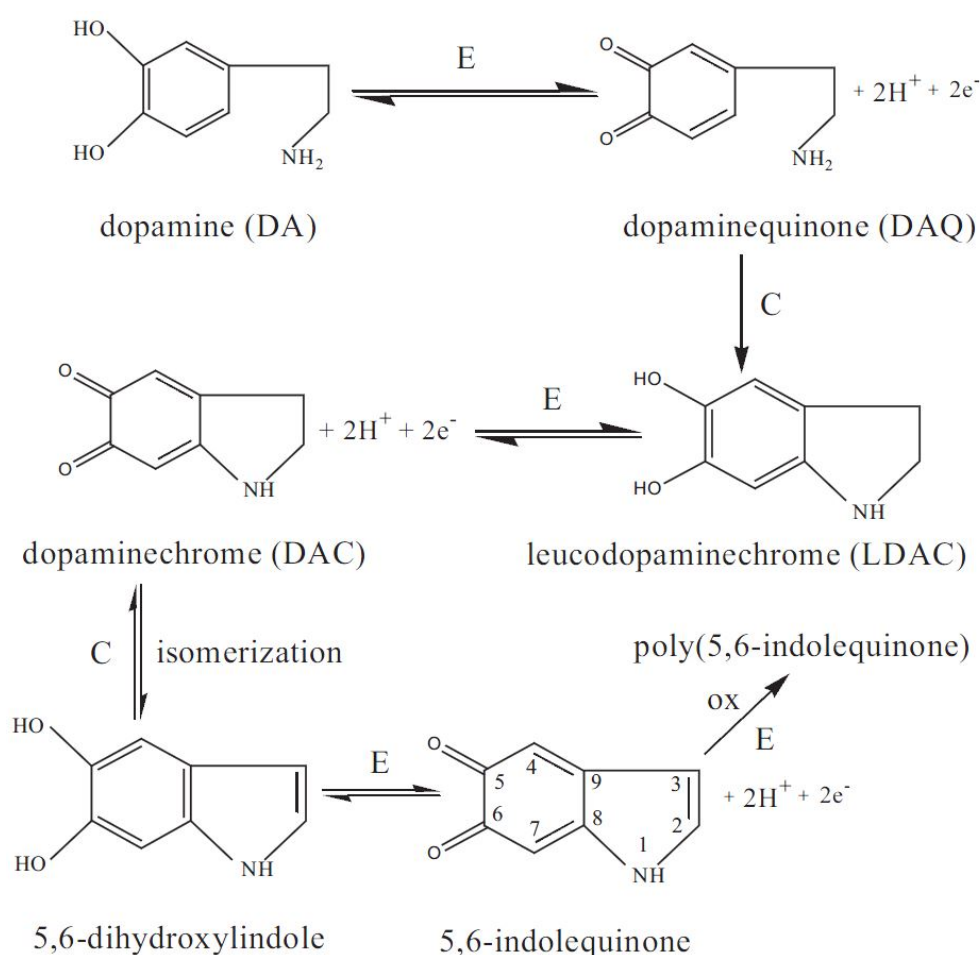


Figura 10. Mecanismo de oxidación de la dopamina [152].

Todos los subproductos de oxidación de la dopamina no son fácilmente detectables electroquímicamente, aunque sus efectos son evidentes al observar la evolución del voltamperograma cuando se le somete al electrodo a varios ciclos de

forma consecutiva [152,154]. En la Figura 11 se aprecia un desplazamiento hacia sobrepotenciales mayores del máximo de pico, y una significativa disminución de la intensidad del mismo, indicando la inactivación de la superficie electródica cuando se realizan diversas voltamperometrías diferencial de impulsos consecutivas [154].

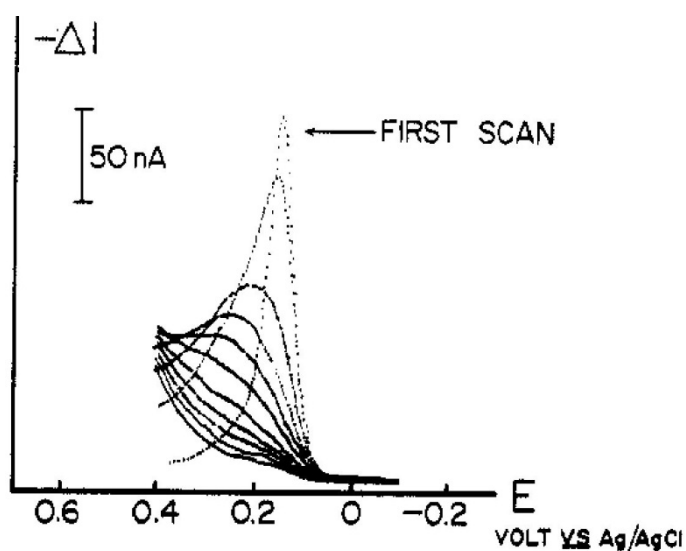


Figura 11. Voltamperograma diferencial de impulsos de dopamina 0.1 mM utilizando un electrodo de trabajo de platino [154].

Haciendo barridos cíclicos hasta valores más negativos de potencial se puede llegar a detectar la oxidación-reducción reversible del DAC, el primero de estos subproductos (Figura 12). En cualquier caso, la progresiva separación de los picos relacionados con la dopamina y con el DAC así como la disminución de la intensidad del pico relacionado con la dopamina, muestra esta inactivación [152].

Una variable que condiciona esta reversibilidad, y dificulta parcialmente la aparición de estos subproductos es el pH del medio de reacción (Figura 13), [152,157]. Se ha comprobado que la presencia de concentraciones relativamente altas de protones, inhibe al menos parcialmente, la reacción de ciclación por acoplamiento intramolecular de la dopaminoquinona (Figura 13). Esto implica una menor inactivación del electrodo, haciendo posible estudiar esta reacción sin estos productos de reacciones laterales, siendo significativamente más sensibles las señales voltamperométricas ya que al disminuir el pH se aprecia un aumento apreciable del pico anódico.

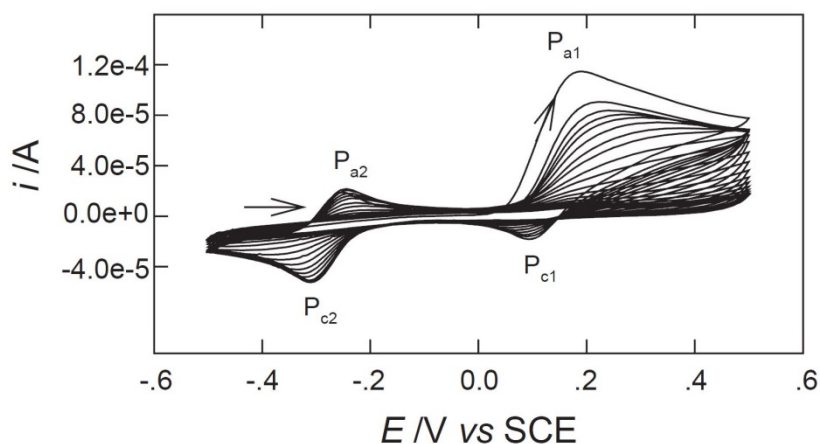


Figura 12. Voltamperograma cíclico de dopamina 2 mM utilizando un electrodo de trabajo de oro [152].

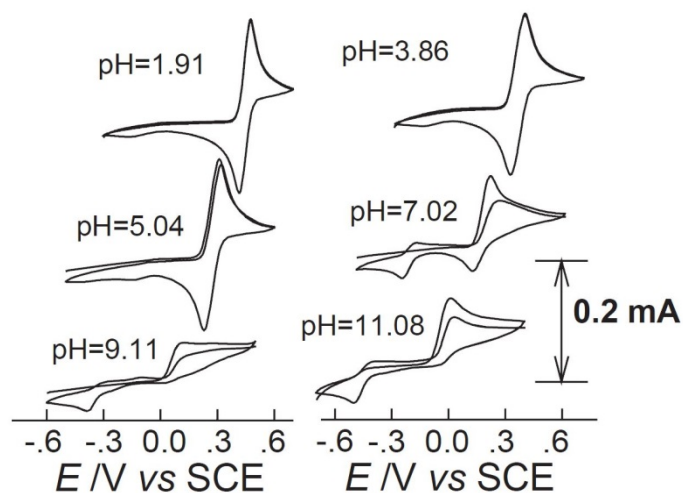


Figura 13. Voltamperogramas cíclicos de dopamina 2 mM en disoluciones con diferentes pH utilizando un electrodo de trabajo de oro [152].

1.3.2 ADRENALINA

La adrenalina (Figura 14), también conocida como epinefrina, es una hormona y un neurotransmisor del grupo de las catecolaminas con funciones relacionadas con el control de diferentes procesos fisiológicos en los sistemas vivos [158,159]. La ruta de biosíntesis de éstas y otras catecolaminas, como noradrenalina o dopamina, parten del

mismo aminoácido, L-tirosina, y bajo la acción de diferentes enzimas generan estos neurotransmisores [160].

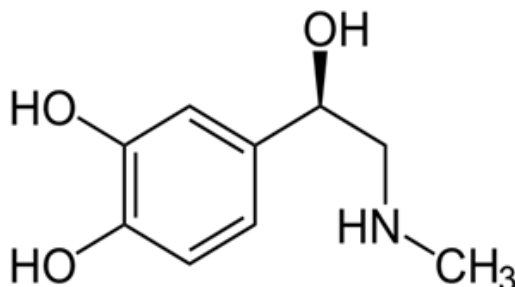


Figura 14. Estructura de la adrenalina

El estudio y comprensión del comportamiento electroquímico de la adrenalina ayuda significativamente a entender su comportamiento dentro del sistema nervioso central, y tiene además gran relevancia en la investigación farmacológica.

El estudio y determinación de adrenalina en fluidos biológicos, tales como la sangre o la orina, suele ser difícil debido a que suele encontrarse en presencia de diferentes compuestos, como el ácido ascórbico, el ácido úrico u otros neurotransmisores. Estos compuestos se oxidan a potenciales similares al de la adrenalina, lo que supone registrar señales electroquímicas muy complicadas donde aparecen solapadas las respuestas de todos estos analitos, siendo realmente complicado aislar la contribución de cada uno de ellos. Una alternativa desarrollada ampliamente para superar este problema ha sido el de modificar químicamente la superficie del electrodo de trabajo, lo que ha llevado en muchas ocasiones a mejorar la respuesta electroquímica discriminando entre los diferentes compuestos presentes en el medio de reacción, lo que ha llevado a aumentar la selectividad de los métodos de análisis de adrenalina [133,134,136,161,162] (Tabla 2).

1.3.2.1 Mecanismo de oxidación de la adrenalina.

En medios muy ácidos la adrenalina (AD) se oxida hasta adrenalinoquinona (ADQ), una quinona de cadena abierta (ec. 1, Figura 15) [163].

1. Fundamento teórico

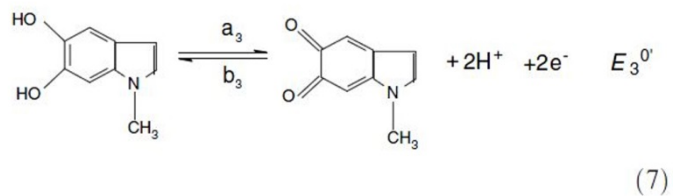
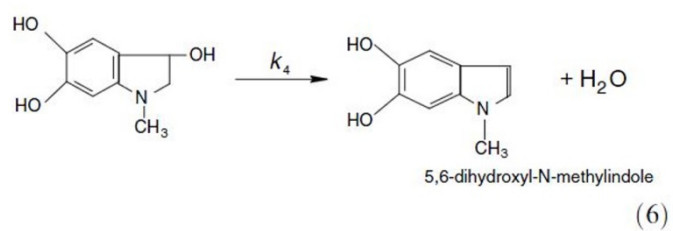
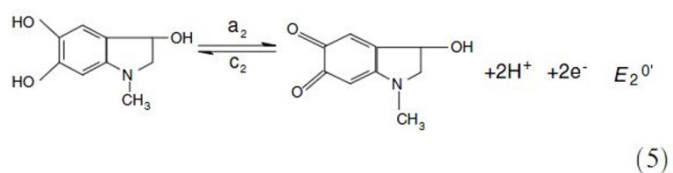
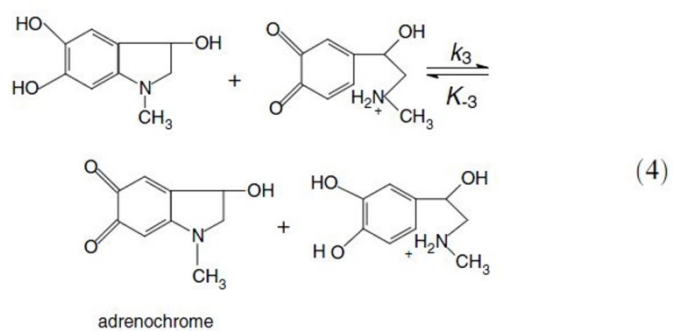
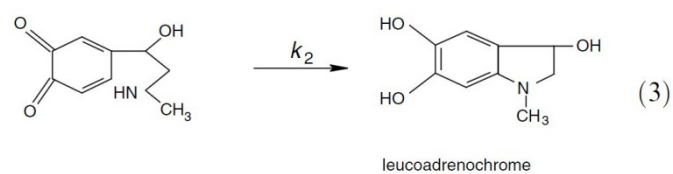
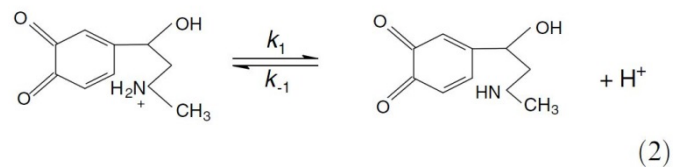
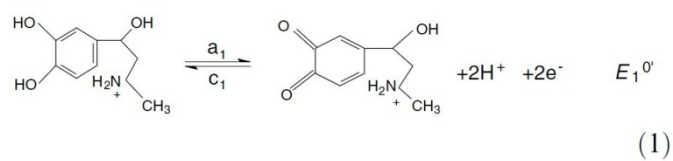


Figura 15. Mecanismo de oxidación de la adrenalina en pH ligeramente ácido o neutro [163].

En medios ligeramente ácidos o neutros, el mecanismo de oxidación de la adrenalina es más complejo, estando descrito como un mecanismo ECCECE (E: electroquímico, C: químico) [163–166], tal y como se muestra en la Figura 15. La primera etapa pasa por la formación de ADQ (ec. 1, Figura 15), que vía una reacción de adición intramolecular genera leucoadrenocromo (LADC), ec. 2-3, Figura 15. LADC puede participar en tres reacciones. Por una parte, puede reaccionar con ADQ a través de una reacción de desproporción generando adrenocromo (ADC) y adrenalina (ec. 4, Figura 15). Por otra, ya que el LADC es más fácilmente oxidable que la AD, éste puede oxidarse electroquímicamente hasta ADC (ec. 5, Figura 15). Y, por otra parte, LADC puede deshidratarse hasta 5,6-dihidroxi-N-metilindol, susceptible de oxidarse hasta 5,6-diquinona-N-metilindol (ec. 6-7, Figura 15).

A pH básico, igual o superior a 9, está descrito que la AD no se puede oxidar ya que prevalece una reacción de desproporción de ésta, ya que su pK_a está en torno a 8 [167], lo que evita su adsorción sobre la superficie electródica [168]. Existe igualmente una clara correlación entre el pH de la disolución y la posición del pico de oxidación de AD a ADQ, que se desplaza hacia potenciales más bajos cuanto mayor es el pH del medio (Figura 16).

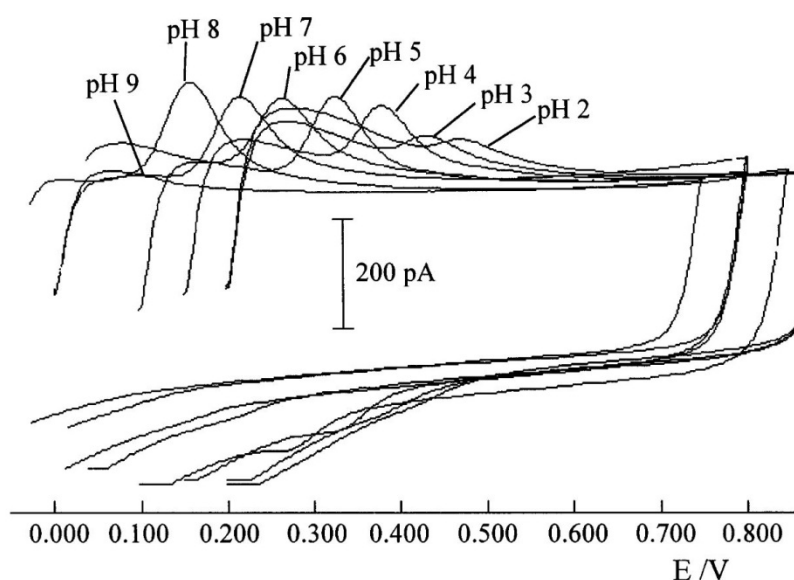


Figura 16. Voltamperogramas cíclicos de adrenalina 2 ppm en disoluciones con diferentes pH utilizando un ultramicroelectrodo de carbono [168].

1.3.3 L-DOPA

L-dopa o levodopa (Figura 17), es un aminoácido que actúa como precursor biológico de las catecolaminas, en particular de la dopamina [29,169]. Se metaboliza a través de una reacción enzimática con la dopa-decarboxilasa para generar dopamina. Esta función de precursor de la dopamina es la principal razón para ser uno de los medicamentos más ampliamente utilizados para el tratamiento del Parkinson, ya que la dopamina directamente no puede atravesar la barrera flujo sanguíneo/cerebro [130,170]. Por lo tanto, la L-dopa es una fuente indirecta de dopamina que ayuda a mejorar muchos de los problemas motores asociados con el Parkinson en las primeras etapas de esta enfermedad [171,172]. El problema se encuentra en que tratamientos a largo plazo con L-dopa inducen fluctuaciones motoras y disquinesia de forma mucho más frecuente en los pacientes [130,171,172]. Todo esto lleva a que sea necesario el desarrollo de técnicas de análisis más eficientes y sensibles que permitan estudiar el contenido de L-dopa en fluidos biológicos.

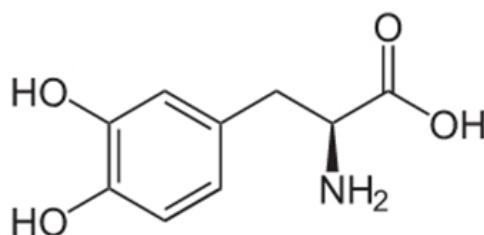


Figura 17. Estructura de la L-dopa.

La determinación de L-dopa se ha realizado tradicionalmente con técnicas espectroscópicas [29,126,128,129,173–175], cromatográficas [148,149,151,176–178], de electroforesis [141,179,180] o de espectrometría de masas [148,177,181]. Las técnicas electroquímicas, como la amperometría o la voltamperometría, han resultado ser de gran utilidad en los últimos 30 años para estudiar muchas de las catecolaminas, entre ellas la L-dopa [169,170,182]. El principal problema de estas técnicas, al igual que ocurre con otros neurotransmisores como la dopamina o adrenalina, radica en la diversas sustancias presentes en los medios biológicos que pueden actuar de interferentes en el estudio y determinación de L-dopa u otras catecolaminas. Para solventar este problema se han desarrollado un gran número de sensores

electroquímicos que habitualmente suponen la modificación de la superficie electroda con diferentes especies como nanotubos de carbono, polímeros, nanopartículas metálicas, etc [130,140,183,184].

Algunos trabajos han planteado de forma puntual la combinación de técnicas electroquímicas y espectroscópicas permitiendo para estudiar la oxidación de la L-dopa en medio neutro [29,185], permitiendo determinar su mecanismo de reacción, y combinando la detección espectroscópica con la separación con electroforesis capilar determinar los intermedios de reacción [179].

1.3.3.1 Mecanismo de oxidación de la L-Dopa

El proceso de oxidación enzimático de la tirosina en medio neutro, precursor de la L-dopa, está descrito desde 1927 [186]. Según ese mecanismo [179,187], ampliamente aceptado, la L-dopa es oxidada hasta la o-quinona dopaquinona, la cual es muy inestable. Ésta sufre una reorganización de forma que la cadena lateral se cicla obteniéndose el leucodopacromo que se oxida hasta un producto coloreado denominado dopacromo. Este compuesto ciclado y oxidado, es también inestable por lo que sufre de nuevo un proceso de reorganización interna generando como productos de la reacción dos productos con estructura indólica, que posteriormente pueden participar en procesos de polimerización obteniéndose finalmente polímeros con estructura similar a la melanina.

El proceso de oxidación electroquímica a pH neutro de L-dopa implica un mecanismo de reacción EC (electroquímico-químico), similar al enzimático [29], Figura 18.a. De modo que la L-dopa sufre un proceso de electrooxidación en la superficie del electrodo hasta dopaquinona. A pH neutro, y conociendo los valores de pKa de la L-dopa [188], se puede afirmar que la L-dopa y, por lo tanto la dopaquinona, están en su forma desprotonada en el grupo carboxilo, teniendo el compuesto una carga neta de cero. En estas condiciones en que no hay protones suficientes para que el grupo carboxilo esté en su forma ácida, la dopaquinona sufre una reacción de adición intramolecular de Michael, en la que se produce el ciclado intramolecular del grupo amino con el anillo de la benzoquinona obteniéndose la ciclodopa o leucodopacromo [174]. Está descrito que esta reacción química es lenta [29]. Esta ciclodopa se puede

1. Fundamento teórico

oxidar más fácilmente que la L-dopa, por lo que una vez formada, rápidamente se oxida hasta dopacromo, bien por reacción en la superficie del electrodo o bien por reacción química con la dopaquinona que se produce en gran cantidad en la superficie del electrodo, siendo más probable ésta segunda posibilidad [29]. El dopacromo es nuevamente precursor de un derivado de la melanina [185].

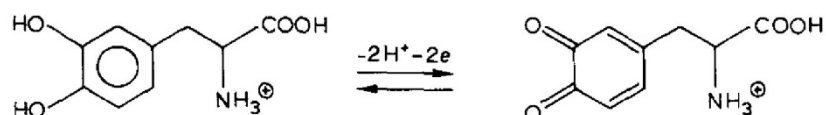
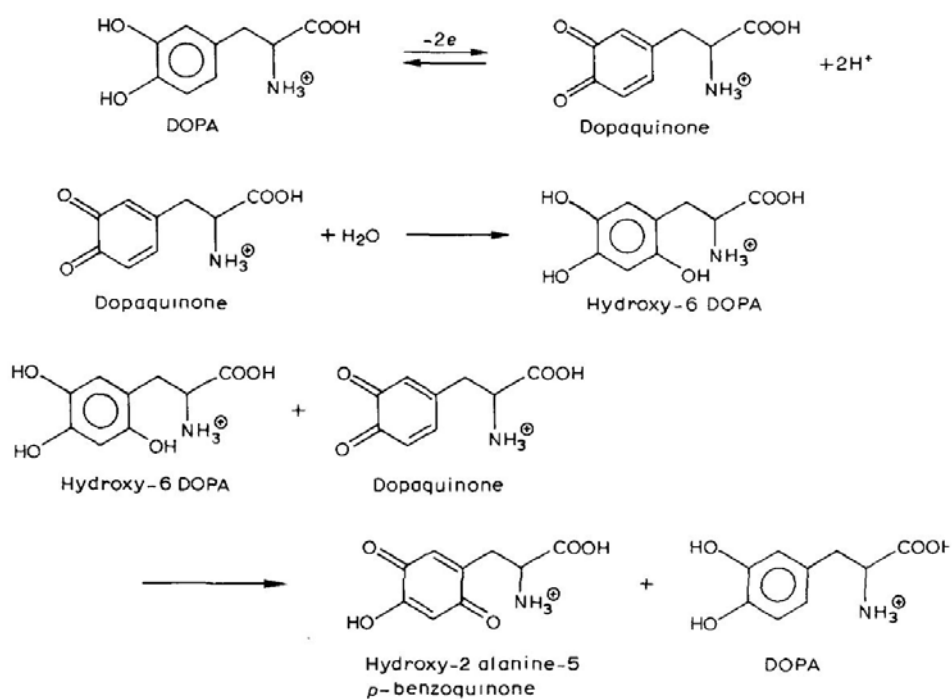
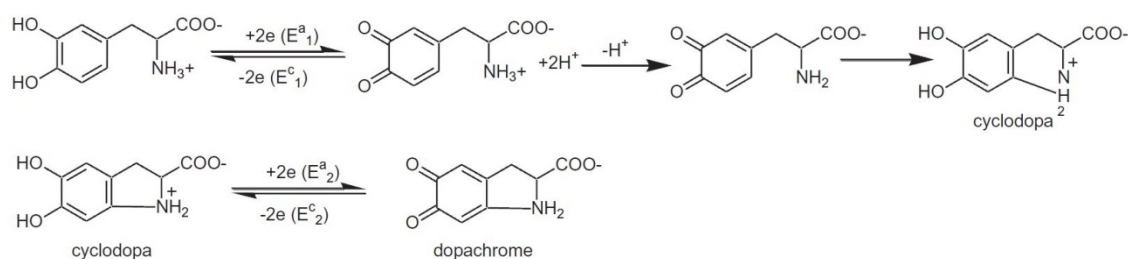


Figura 18. Mecanismo de electrooxidación de la L-dopa (a) en medio neutro (pH = 6-7) [189] y

(b) en medio ligeramente ácido ($\text{pH} = 2-3$), y (c) en medio muy ácido ($\text{pH} = 0$) [187].

Al igual que en el resto de neurotransmisores de la familia de las catecolaminas, hay un claro efecto del pH en el proceso de oxidación de la L-dopa. La Figura 19 muestra los voltamperogramas obtenidos en diferentes condiciones de pH. Así en medio muy ácido ($\text{pH} = 0$) únicamente se observa un par de picos relacionados con la oxidación de L-dopa a dopaquinona, mostrando una gran estabilidad la o-quinona (Figura 19.a), siendo el mecanismo el mostrado en la Figura 18.c.

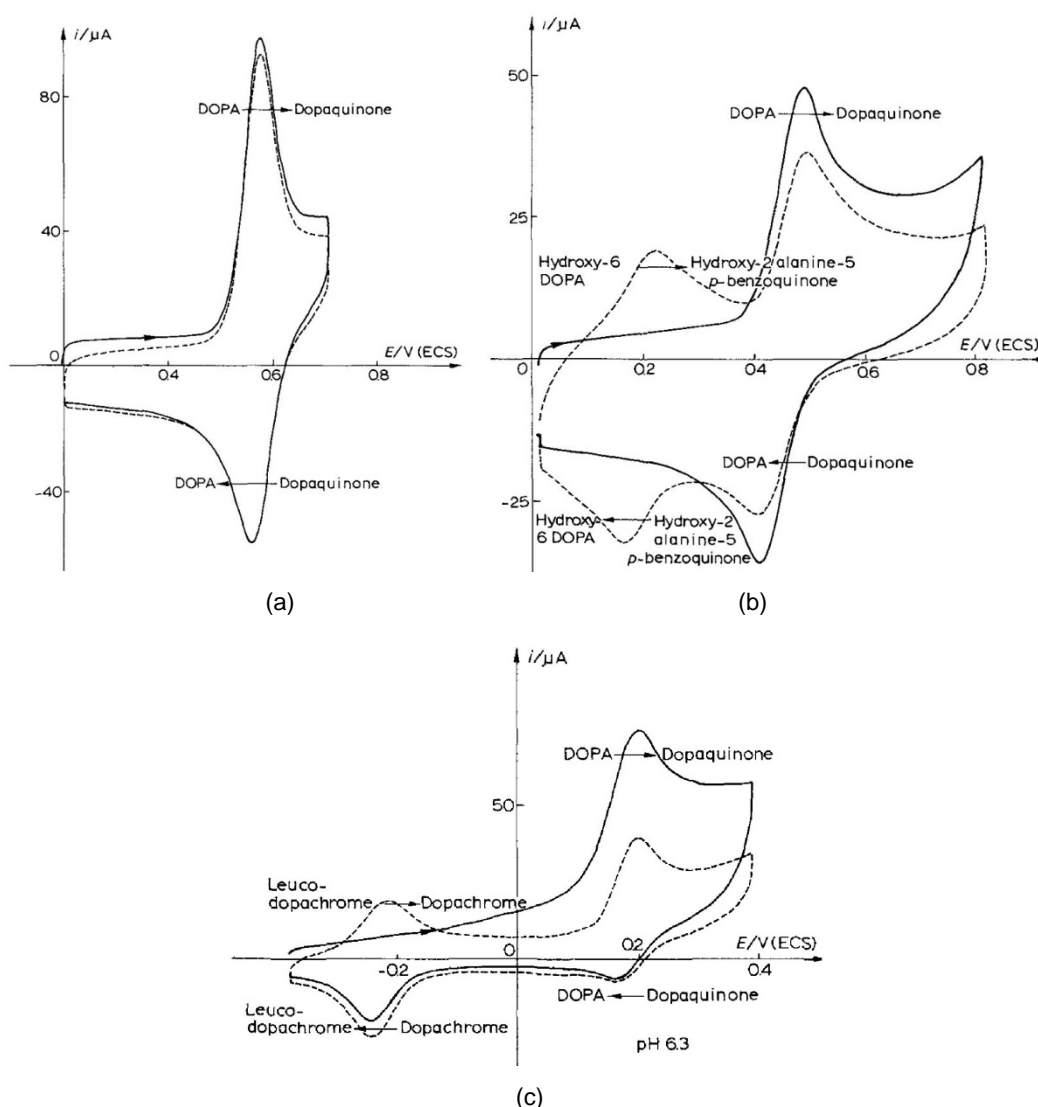


Figura 19. Voltamperogramas cíclicos de oxidación L-dopa 1 mM sobre electrodo de grafito (a) en medio muy ácido ($\text{pH} = 0$), (b) en medio ligeramente ácido ($\text{pH} = 2$), y (c) en medio neutro ($\text{pH} = 6.3$) [187].

En cambio cuando el pH aumenta hasta valores de 2 o 3, aunque prevalece esta primera oxidación, con el ciclado sucesivo emerge otro par de picos relacionados con la oxidación del leucodopacromo a dopacromo (Figura 19.b), tal y como muestra el esquema de reacción mostrado en Figura 18.b. Finalmente, en medio neutro, tal y como se ha explicado en el mecanismo de reacción (Figura 18.a), los dos procesos de oxidación se aprecian claramente, siendo destacable la significativa disminución del pico de reducción del proceso L-dopa/dopaquinona debido a la inestabilidad de la dopaquinona en medio neutro y la prevalencia del segundo proceso (Figura 19.c).

1.3.4 CATECOL

El catecol (Figura 20) es un isómero del dihidroxibenceno [63,190,191] considerado como contaminante medioambiental por la agencia de protección del medio ambiente de Estados Unidos (EPA) y de la Unión Europea (EU) debido a su alta toxicidad, incluso a muy bajas concentraciones [192,193], y a su baja degradabilidad. Por esta razón este derivado fenólico, al igual que otros fenoles, genera problemas importantes de salud en los humanos y en los animales, afectando igualmente a los medios acuáticos y a las plantas [194,195]. Así por ejemplo, el catecol es un componente de los cigarrillos y se piensa que podría estar relacionado con el desarrollo de diferentes tipos de cánceres. El catecol es usado junto con otros derivados fenólicos en múltiples industrias como la del caucho, la minera, la farmacéutica, la de los pesticidas, los colorantes y pinturas o la del aceite [194–196]. Además puede actuar como agente quelante en la química de coordinación y atrapar radicales [197].

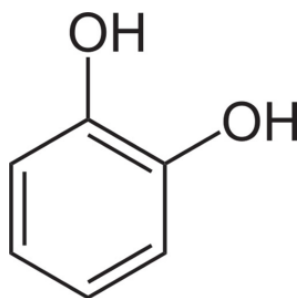


Figura 20. Estructura del Catecol

Por todas las razones anteriormente indicadas resulta necesaria la determinación de catecol en medios, que en muchas ocasiones presentan interferentes con estructuras similares como, por ejemplo, las catecolaminas u otros bifenoles. Todos estos compuestos con estructuras derivadas del catecol tienen espectros de absorción muy similares, y potenciales normales de reducción con valores muy cercanos [121,128,173,198]. Se han utilizado diferentes métodos para su estudio y cuantificación como la fluorescencia, la electroforesis capilar, la espectroscopía de absorción molecular o la electroquímica [121,128,129,199–201]. Técnicas espectroelectroquímicas también han demostrado ser útiles en el estudio de la oxidación de esta molécula al ofrecer simultáneamente la evolución de los espectros al variar de forma controlada el potencial aplicado [16,202].

1.3.4.1 Mecanismo de oxidación del catecol

En medio ácido y pH neutro, la electrooxidación del catecol es un proceso quasi-reversible de dos electrones en el que el producto de reacción es la *o*-benzoquinona [203], Figura 21.a.

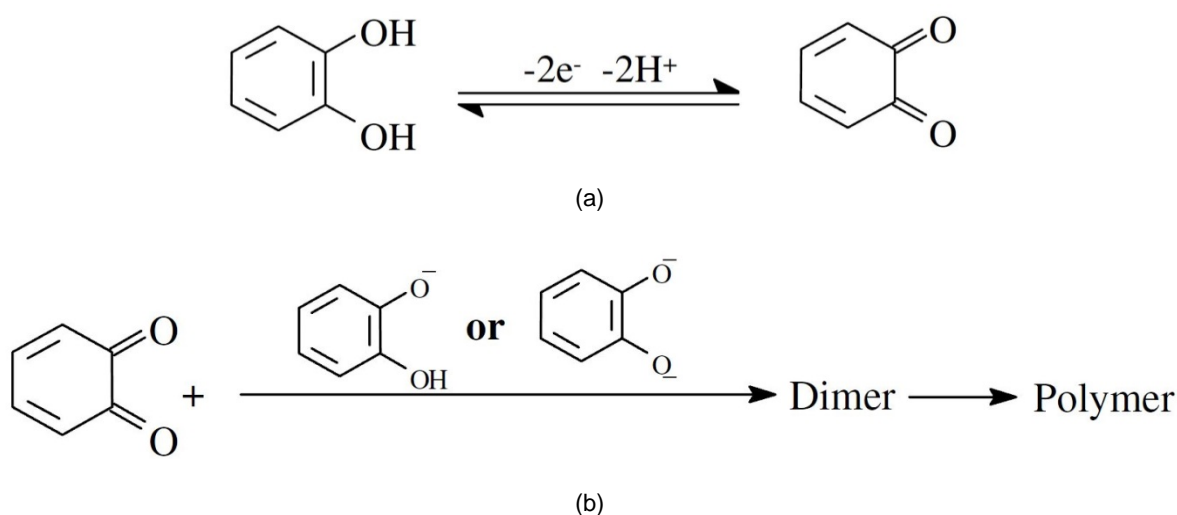


Figura 21. (a) Mecanismo de oxidación del catecol en medio ácido y neutro. (b) Proceso de hidroxilación y/o dimerización de la *o*-benzoquinona [203].

En estos casos, la relación entre las intensidades del pico anódico y del catódico (I_{an}/I_{cat}) da una idea de la estabilidad del producto de la reacción, la forma quinónica del catecol. Si esa relación es igual a la unidad se puede considerar que la *o*-benzoquinona

es estable (Figura 22.a). En cambio, si esa relación se aleja de la unidad reacciones laterales tienen lugar, indicando la inestabilidad de la *o*-benzoquinona debido a la posibilidad de que reacciones de hidroxilación y/o dimerización tengan lugar (Figura 21.b y Figura 22.b).

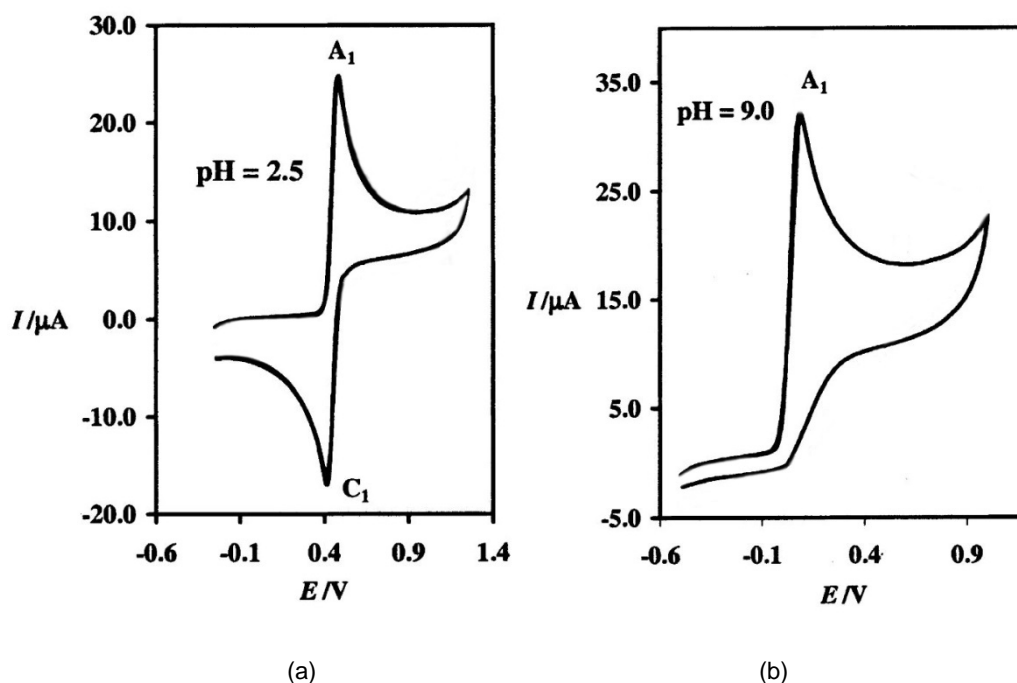


Figura 22. Voltamperogramas cíclicos de oxidación del catecol (a) en medio ácido [203], y (b) en medio básico [203].

A valores de pH iguales o superiores a 7, se produce el acoplamiento entre las formas aniónicas y/o dianiónicas del catecol con la *o*-quinona, generándose en última instancia un compuesto polimérico con estructura tipo melanina [203,204], Figura 21.b. Esas formas aniónicas se forman por disociación ácida del catecol que tiene lugar a pH superiores a 7 [205], razón por la cual cuanto mayor es el pH menos estable es la forma oxidada del catecol produciéndose esa reacción de polimerización.

2. DISEÑO, CONSTRUCCIÓN Y VALIDACIÓN DEL DISPOSITIVO ESPECTROELECTROQUÍMICO

2. *Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico*

2.1 INTRODUCCIÓN

Desde un punto de vista experimental, el desarrollo de la Espectroelectroquímica como técnica analítica se ha visto condicionado por la inexistencia en el mercado de equipos comerciales compactos capaces de llevar a cabo este tipo de medidas. Se han propuesto algunos equipos de espectroelectroquímica en el que se acoplaban un equipo electroquímico con uno espectrofotométrico a través de una celda espectroelectroquímica [206–210]. Estos dispositivos propuestos hasta el momento presentan las ventajas de poder realizar este tipo de medidas, habiendo desarrollado algunas de estas casas comerciales incluso celdas y/o electrodos útiles en este tipo de experiencias. En cambio, estos equipos, en general, presentan algunas desventajas que han hecho que aún hoy en día no sea una técnica ampliamente utilizada en diversos campos científicos. Entre estas desventajas están la dificultad de realizar las medidas ya que en realidad en todos los casos se trata de dos equipos independientes conectados a través de una celda, con el problema que supone el tener que controlar dos software diferentes, uno por equipo. Esta gran desventaja se ha visto superada por un equipo compacto de espectroelectroquímica desarrollado por DropSens S.L. en colaboración con el grupo de análisis instrumental de la Universidad de Burgos, que recientemente ha sido lanzado al mercado [211]. Además las celdas y electrodos propuestos no siempre cumplen las expectativas de los investigadores debido a falta de reproducibilidad en algunos casos, dificultad de montaje en otros, o problemas asociados a los electrodos utilizados, sobre todo en cuanto al electrodo de trabajo se refiere.

Dado que algunos de los principales problemas en espectroelectroquímica son los asociados a las celdas y electrodos, uno de los principales objetivos de esta tesis ha sido el desarrollo de una celda de espectroelectroquímica útil para trabajar en absorción en la región del UV/Vis utilizando electrodos serigrafiados. Concretamente, los objetivos operativos han sido los siguientes:

- ✓ Diseño y optimización del dispositivo experimental, que implica un correcto acoplamiento de los diferentes elementos asegurando así, medidas

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

espectroelectroquímicas fiables, reproducibles y realmente informativas sobre los procesos estudiados.

- ✓ Sistematización del procedimiento de medida, sincronizando correctamente el dispositivo electroquímico y el espectroscópico, para obtener baterías de datos perfectamente correlacionados entre sí.
- ✓ Desarrollo de programas informáticos adecuados para el tratamiento sistemático y fiable del gran volumen de datos generados.
- ✓ Validación de la celda espectroelectroquímica utilizando para ello tolidina como sistema de referencia.
- ✓ Aplicación de la celda espectroelectroquímica para el estudio de diversos neurotransmisores.

Los elementos básicos de un equipo espectroelectroquímico convencional se pueden reducir a cuatro, adaptados en nuestro caso a medidas absorciométricas en la región espectral del UV/Vis

- *Equipo electroquímico*: potencióstato/galvanostato
- *Equipo espectroscópico*: espectrofotómetro de absorción en la región UV/Vis
- *Celda espectroelectroquímica*
- *Sistema de sincronización*: trigger o disparador

La Figura 23 muestra un esquema de un equipo espectroelectroquímico con los elementos básicos imprescindibles para realizar este tipo de experiencias. Como se ha comentado, el elemento clave del dispositivo es la celda espectroelectroquímica, ya que es el nexo de unión entre los equipos y además, es el lugar donde ocurre la reacción química estudiada. Por otro lado, el disparador juega un papel determinante en las experiencias para asegurar una adecuada relación entre la información obtenida con el potencióstato y con el espectrofotómetro.

A continuación se van a describir los diferentes elementos y acoplamientos realizados, así como a explicar de forma más detallada las particularidades de la celda desarrollada en esta tesis doctoral.

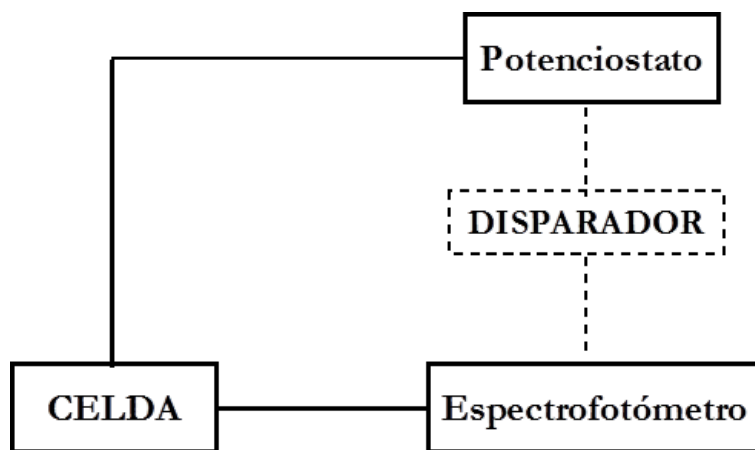


Figura 23. Esquema básico de un equipo espectroelectroquímico convencional.

2.2 REACTIVOS

Se prepararon disoluciones acuosas de dopamina (Acros Organics, 99%), epinefrina (Acros Organics, 99%), L-dopa (Acros Organics, 99%) y/o catecol. El pH se controló utilizando un tampón fosfato con una concentración 0.2 M (Na_2HPO_4 (Merck)/ NaH_2PO_4 (Panreac)). Este tampón fue preparado mezclando volúmenes adecuados de dos disoluciones de la misma concentración de Na_2HPO_4 y NaH_2PO_4 junto con volumen fijo de una disolución 0.5 M de KCl (Panreac, 99%), llevándolo a un volumen final de 50 mL. En todas las disoluciones el pH se ajustó a 7.

Todas las disoluciones se prepararon diariamente usando agua desionizada (MilliQ gradient A10 system, Millipore, Bedford, MA).

2.3 EQUIPO ELECTROQUÍMICO

El equipo electroquímico consistió en un potenciostato/galvanostato convencional, cuyas características fueron:

- ✓ Control riguroso del potencial y la intensidad de corriente.

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

- ✓ Versatilidad en cuanto al tipo de técnicas electroquímicas.
- ✓ Incluir un trigger o disparador para sincronizar las medidas electroquímicas y espectroscópicas.
- ✓ Software adecuado para la programación y gestión del experimento que se quiere realizar.

En base a estos puntos, el potenciostato/galvanostato elegido fue el AUTOLAB PGSTAT302N (Figura 24), se trata de un potenciostato/galvanostato modular que puede generar una intensidad de corriente máxima de 2 A, pudiendo ser ampliada hasta 20 A acoplándole un módulo BOOSTER20A. Además, su ancho de banda se extiende hasta más de 1 MHz, proporcionando a este equipo una elevada versatilidad y rapidez en las medidas, lo cual se ve incrementado por la posibilidad de acoplar dispositivos externos mediante entradas y salidas tanto analógicas como digitales.



Figura 24. Potenciostato/galvanostato AUTOLAB PGSTAT302N

Concretamente en voltamperometría cíclica, técnica electroquímica utilizada para llevar a cabo nuestros experimentos, el rango de velocidad máximo que se puede alcanzar es de 200 V/s para el equipo estándar, pudiendo ser ampliado hasta 250 Kv/s en combinación con los módulos SCAN250 y ADC10M.

El software que se utiliza para el tratamiento de los datos electroquímicos recogidos es el GPES el cual permite la preparación de experimentos, el registro de puntos de datos y los análisis de datos para crear gráficos de forma sencilla y cuyo formato de salida es perfectamente adaptable para su tratamiento combinado con los datos espectroscópicos recogidos de forma simultánea.

2.4 EQUIPO ESPECTROFOTOMÉTRICO

Con el fin de obtener medidas espectroscópicas de calidad se ha configurado nuestro propio sistema óptico ensamblando tres módulos. El equipo espectrofotométrico estándar utilizado es un equipo modular que consta de una fuente de radiación, una sonda de reflexión y un espectrómetro con un dispositivo de carga acoplada (CCD) como detector de la radiación.

Se eligió un detector CCD en vez de un fotomultiplicador porque la batería de diodos permite registrar, de forma simultánea, variaciones de la luz transmitida a varias longitudes de onda obteniéndose a partir de una sola experiencia una gran cantidad de información sobre la evolución espectral global del sistema estudiado. Además, el tiempo de respuesta del detector debe ser lo suficientemente rápido para poder tomar espectros a una velocidad adecuada al proceso analizado.

Como fuente de radiación (AvaLight-DH-S-BAL de Avantes) se ha utilizado una que consta de dos lámparas, una halógena y otra de deuterio, útiles en el rango ultravioleta, visible e infrarrojo cercano (UV-Vis-NIR) desde 200 hasta 2500 nm.

La fuente AvaLight-DH-S-BAL (Figura 25) tiene un innovador diseño óptico, en el que se integra un divisor de haz dicróico para dar un espectro mucho más equilibrado a partir de 200-250nm. La ventaja de este diseño es que el pico alfa a 656 nm se filtra obteniendo un espectro suave y equilibrado.

Se ha usado una sonda de reflexión de 200 μm , modelo H1OH 200-7-UV-Vis/FMD 23294 (Ocean Optics Europe Inc.) para conducir la radiación electromagnética en el dispositivo espectrofotométrico, (Figura 26.a) Esta sonda de reflexión consta de siete fibras ópticas de 200 μm , una central y otras seis adyacentes a esta (Figura 26.b). En este trabajo se utilizó la fibra óptica central para conducir la radiación electromagnética desde la fuente de luz hasta la superficie del electrodo de trabajo, mientras que las seis fibras ópticas adyacentes se utilizaron para recoger el haz de luz reflejado y conducirlo hasta el espectrofotómetro.

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico



Figura 25. Fuente de radiación AvaLight-DHS-BAL de Avantes con dos lámparas (deuterio y halógena).

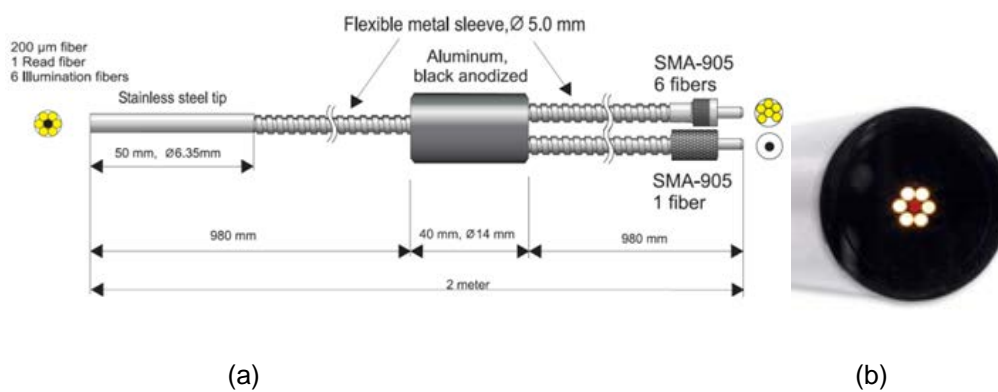


Figura 26. (a) Esquema de la sonda de reflexión, y (b) vista de las 7 fibras ópticas.

El espectrómetro utilizado ha sido el QE65000 (Ocean Optics Europe Inc.), Figura 27. Éste consta de un monocromador Czerny-Turner y un detector Hamamatsu con configuración en 2-D que consta de 1004 pixeles en dirección horizontal y 64 en vertical con una respuesta que cubre el rango espectral entre 200 y 1100 nm.

Tiene una eficiencia cuántica del 90%, con una relación señal-ruido de 1000:1 y una elevada velocidad de procesamiento de datos, y permite registrar espectros completos entre 200 y 1100 nm con un tiempo de integración mínimo de 8 milisegundos. Los espectros se han registrado con el software SpectraSuite (Ocean Optics Europe, Inc.).

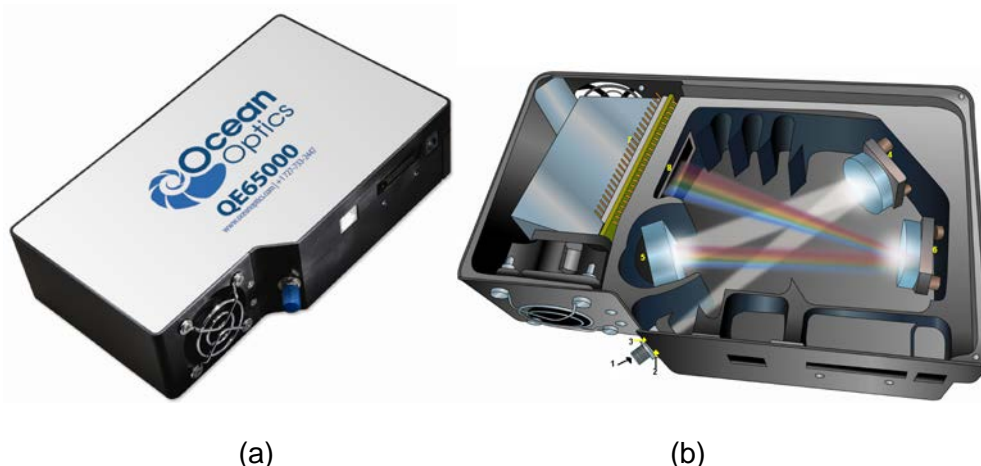


Figura 27. (a) Espectrómetro QE65000 (Ocean Optics Europe, Inc.) y (b) esquema de funcionamiento del mismo donde (1) es el conector para la fibra óptica, (2) es la rendija de entrada, (3) es un filtro, (4) es el espejo colimador, (5) es la red de difracción, (6) es el espejo focalizador, (7) es el detector 2-D y (8) es otro filtro.

2.5 DISPOSITIVO ESPECTROELECTROQUÍMICO

2.5.1 ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

Como se ha expuesto en los puntos anteriores, la espectroelectroquímica, sea cual sea su naturaleza electroquímica y/o espectroscópica, se trata de una técnica que proporciona una respuesta simultánea de ambas señales aportando ventajas como bajos límites de detección, bajo coste del equipo o una relativa simplicidad en la experimentación, pese a la aparente complicación que presenta la obtención de las señales electroquímicas y espectroscópicas.

Por otro lado, los electrodos serigrafiados son un tipo de electrodos cada vez más habituales en el estudio electroquímico de diferentes sistemas químicos eléctricamente activos. Estos electrodos se fabrican mediante la impresión de tintas diferentes sobre sustratos de plástico o cerámica. La composición de las tintas utilizadas para la impresión en los electrodos serigrafiados determina la selectividad y la sensibilidad requerida para cada análisis.

Para el desarrollo de nuestro trabajo se ha hecho uso de electrodos serigrafiados comerciales, cuyas características son excelentes tanto en el análisis

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

como en el coste, puesto que permiten llevar a cabo numerosos experimentos a coste moderado. Además, y como ventaja añadida al uso de estos dispositivos, es que sólo requieren volúmenes de muestra del orden de los microlitros, lo que les hace muy adecuados tanto para investigación y control de calidad, como para el estudio de sistemas reales en los que el volumen de muestra disponible sea muy pequeño.

Para realizar el contacto eléctrico entre el electrodo serigrafiado y el potenciostato se utilizó la caja DSC en el dispositivo experimental inicial (Figura 28.a). En cambio en las medidas realizadas utilizando la celda espectroelectroquímica desarrollada en esta tesis se utilizó un cable conector (Figura 28.b).



(a)



(b)

Figura 28. (a) Conector DRP-DSC (Dropsens S.L.). (b) Cable conector para electrodos serigrafiados (Dropsens S.L.).

Los electrodos serigrafiados utilizados en esta tesis consisten en unas tiras de cerámica de dimensiones 3.4 x 1.0 x 0.05 cm sobre las que se encuentran serigrafiados los tres electrodos que forman el sistema electroquímico (electrodo de trabajo, electrodo auxiliar y electrodo de referencia) además de los contactos eléctricos de plata situados al final de la misma a través de los cuales se realiza la unión al potenciostato. Un esquema de este tipo de electrodos serigrafiados comerciales fabricados por Dropsens S.L. se muestra en la Figura 29. Éstos constan de un electrodo de trabajo de carbono de 4 mm de diámetro, un electrodo auxiliar también de carbono, y un electrodo de referencia de plata.

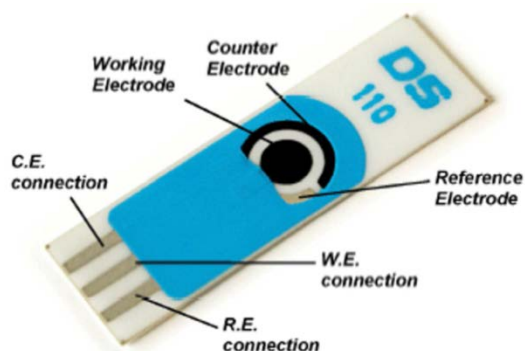


Figura 29. Electrodo serigrafiado de carbono DRP-110 de Dropsens S.L.

2.5.2 DISPOSITIVO ESPECTROELECTROQUÍMICO BÁSICO

La primera parte de este trabajo consistió en poner a punto el dispositivo experimental adecuado para poder realizar experiencias espectroelectroquímicas de alta calidad utilizando electrodos serigrafiados. El esquema de este dispositivo se muestra en la Figura 30.

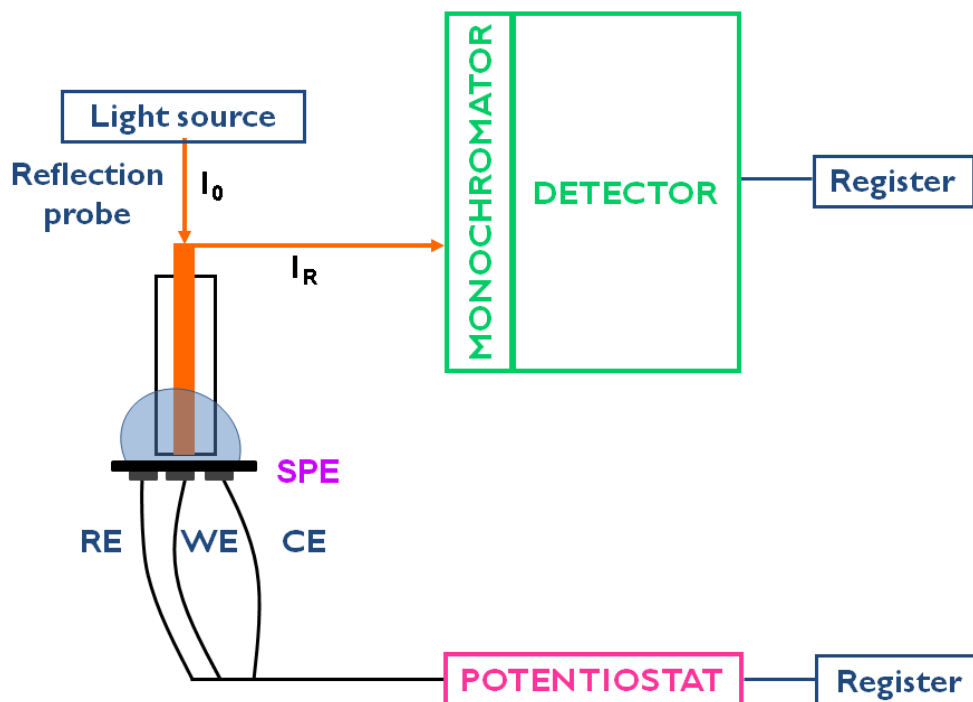


Figura 30. Esquema del montaje experimental para realizar medidas espectroelectroquímicas a la gota con electrodos serigrafiados.

2. *Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico*

En él se diferencian los dos equipos, el electroquímico y el espectroscópico, unidos a través de un disparador o trigger, y el dispositivo de medida donde se sitúa el electrodo serigrafiado, la muestra estudiada y la sonda de reflexión que conduce la radiación desde la fuente hasta el electrodo y la conduce posteriormente hasta el espectrofotómetro. Para llevar a cabo una experiencia espectroelectroquímica con este dispositivo se coloca un volumen conocido de disolución sobre el electrodo serigrafiado, del orden de los 100 μL , asegurando que ésta cubra completamente los tres electrodos. A continuación se introduce la sonda de reflexión en la gota de disolución, manteniendo una distancia fija entre la sonda y la superficie del electrodo de trabajo en la que la señal espectral en la región UV/Vis tenga la máxima intensidad. Se realizan los contactos eléctricos, se programa la experiencia con los softwares correspondientes a cada uno de los equipos y se realiza la experiencia. En todas estas experiencias el control de la experiencia lo tiene siempre el potencióstato, siendo éste el que marca cuando se inicia y se finaliza la misma.

Los principales inconvenientes de este dispositivo de medida radican en, por un lado, la reproducibilidad en la distancia entre la sonda de reflexión y la superficie del electrodo de trabajo, y por otro, la radiación parásita que puede llegar al detector ya que no se trabaja en un sistema cerrado y aislado.

2.5.3 CELDA ESPECTROELECTROQUÍMICA PARA ELECTRODOS SERIGRAFIADOS

Con el fin de solventar los problemas indicados en el dispositivo anterior, se utilizó una celda espectroelectroquímica desarrollada por el grupo de Análisis Instrumental de la Universidad de Burgos en colaboración con la empresa DropSens S.L., útil para trabajar con electrodos serigrafiados. Esta celda está fabricada en teflón, tiene unas dimensiones de 30.15 x 26.78 x 28.65 mm (Figura 31), y consta de dos piezas unidas con cuatro imanes colocados en las esquinas de cada una de ellas. La pieza inferior tiene una ranura para colocar el electrodo serigrafiado. La pieza superior tiene un orificio, con el diámetro de la sonda de reflexión, que la atraviesa transversalmente. La posición de este orificio es tal que la sonda de reflexión una vez introducida en la celda esté situada sobre el electrodo de trabajo de carbono. Por otra parte, este orificio tiene un tope en la parte interior que garantiza que la distancia entre

la sonda de reflexión y la superficie del electrodo sea constante e igual a la distancia focal de las fibras ópticas de 200 μm de que consta la sonda. La parte interna de esta pieza tiene una ranura circular para alojar una junta tórica que garantiza la hermeticidad de la celda una vez añadida la disolución.

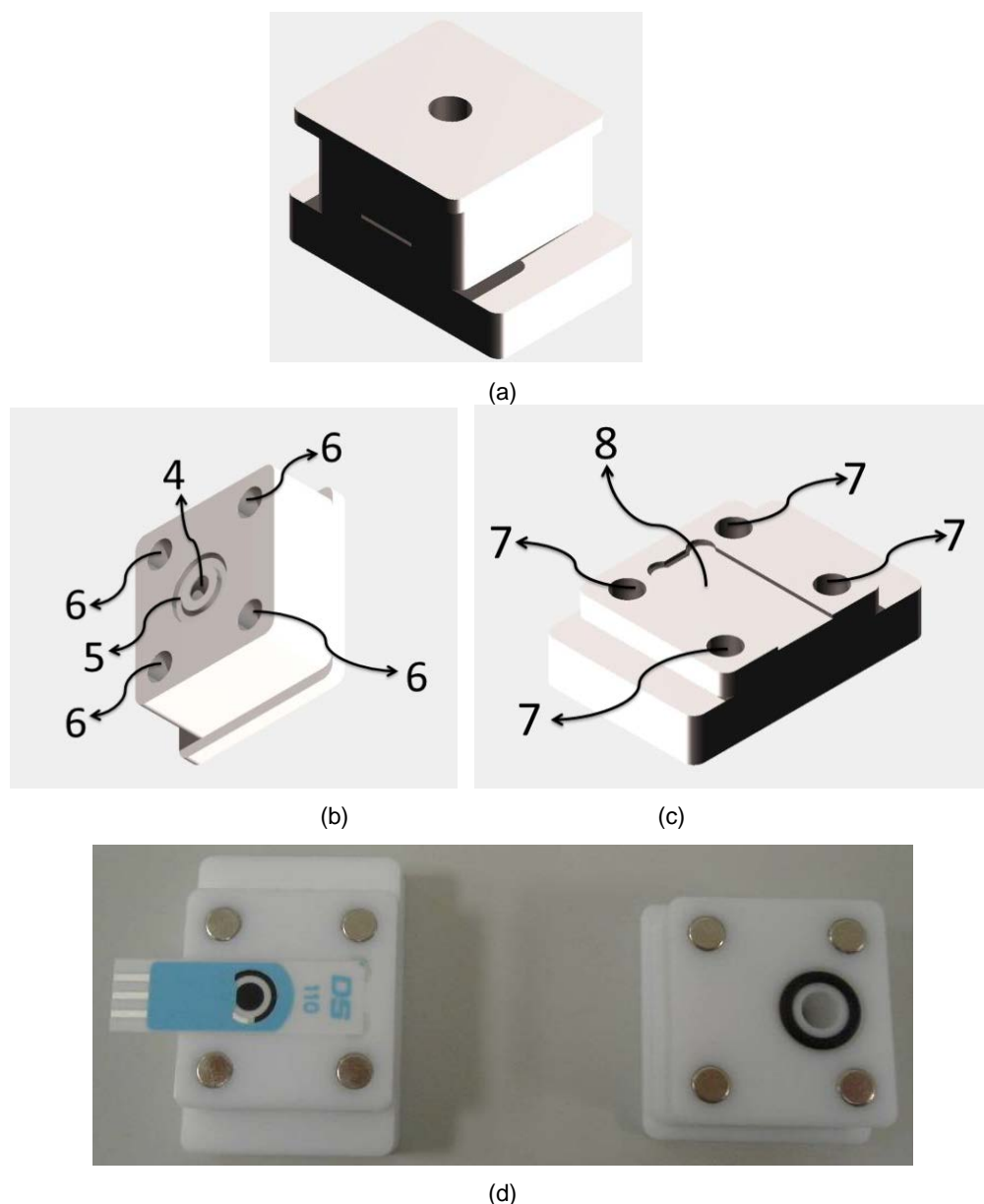


Figura 31. Esquema de la celda espectroelectroquímica desarrollada por el grupo de Análisis Instrumental de la Universidad de Burgos en colaboración con la empresa DropSens S.L. (a) Vista de la celda montada. Despiece de la celda (b) parte superior y (c) parte inferior. (d) Imagen de la celda con el electrodo serigrafiado.

2.5.4 DISPOSITIVO ESPECTROELECTROQUÍMICO

La etapa clave del diseño, construcción y montaje del dispositivo instrumental utilizado en este trabajo para realizar las medidas espectroelectroquímicas fue el acoplamiento de los dispositivos electroquímico y espectroscópico. Esta unión se establece a través de la celda espectroelectroquímica fabricada. En este caso se realiza colocando 50 μL de disolución sobre la superficie circular del electrodo serigrafiado (Figura 29) de manera que la disolución de trabajo cubra los tres electrodos del dispositivo antes de cerrar herméticamente la celda. A continuación, se añaden otros 50 μL de disolución a través del orificio practicado en la pieza superior de la celda para evitar la formación de burbujas cuando posteriormente se introduce la sonda de reflexión a través de dicho orificio.

La Figura 32 muestra cómo se realizan las conexiones de la sonda y el conector eléctrico con la celda espectroelectroquímica.

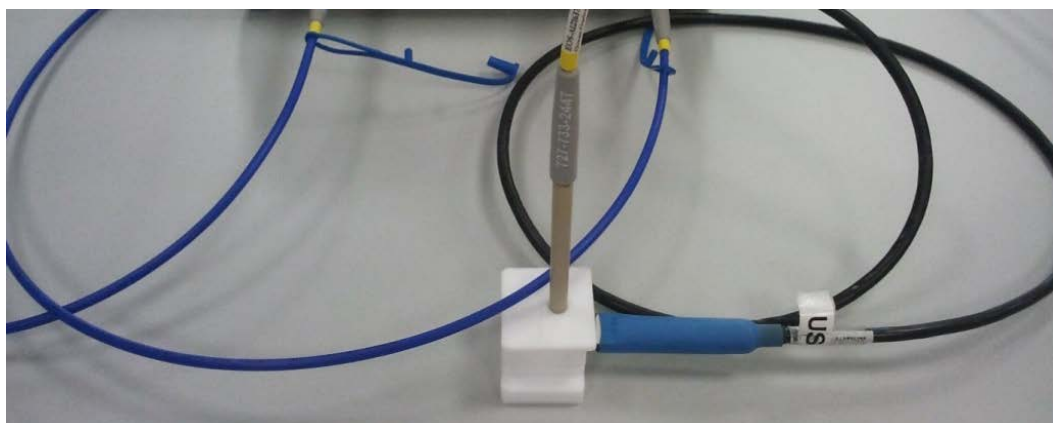


Figura 32. Montaje experimental final de la celda con la sonda de reflexión y el contacto eléctrico para el electrodo serigrafiado.

Por otro lado la Figura 33 muestra el esquema del montaje experimental utilizado en este trabajo cuando se ha hecho uso de la celda espectroelectroquímica desarrollada (Figura 31).

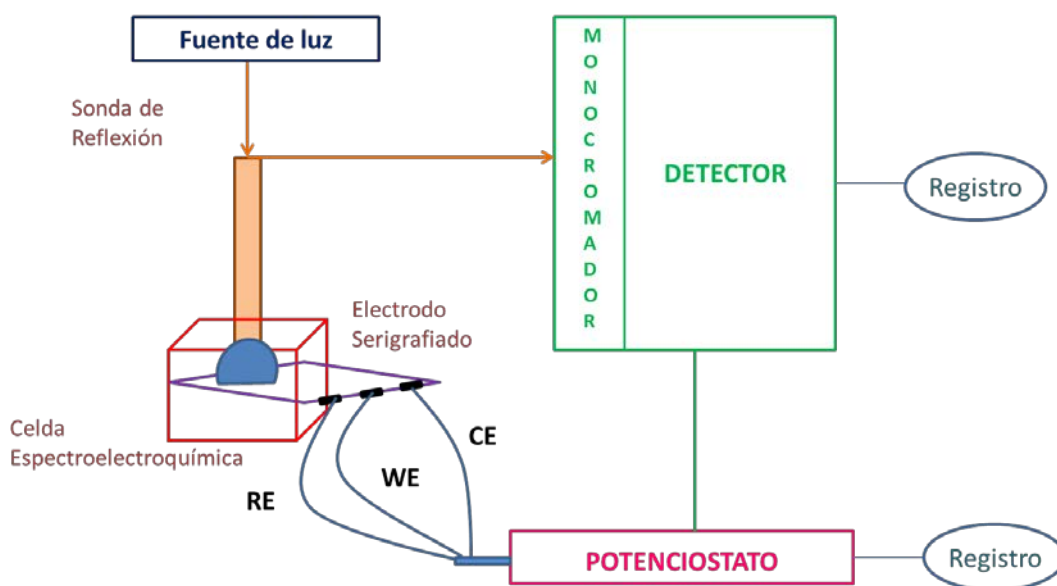


Figura 33. Esquema del dispositivo espectroelectroquímico para medidas de reflexión que utiliza un electrodo serigrafiado situado en la celda espectroelectroquímica desarrollada.

2.6 VALIDACIÓN DE LA CELDA ESPECTROELECTROQUÍMICA

Previa a la utilización sistemática en el estudio de neurotransmisores de la celda espectroelectroquímica desarrollada (Figura 31) y del dispositivo instrumental propuesto (Figura 33), se validaron utilizando diversos sistemas de referencia habituales en espectroelectroquímica, como son el ferrocianuro, el complejo de rutenio(II) tris(2,2'-bipiridina), $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})$, el carmín de índigo, y la o-tolidina.

2.6.1.1 Oxidación de ferrocianuro

La reacción de oxidación/reducción del par ferrocianuro/ferricianuro es un proceso cuasi-reversible donde se intercambia un electrón. Este par se caracteriza por ser incolora la disolución de ferrocianuro y amarillenta la de ferricianuro.

Como primer test de validación se realizó una experiencia voltamperométrica barriendo de forma cíclica el potencial entre 0.00 y +0.45 V a una velocidad de $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. Para ello se utilizó una disolución de ferrocianuro potásico 0.01 M en 1.36 M de nitrato potásico. El tiempo de integración espectral, es decir, el tiempo tras el cual

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

registra un espectro completo de absorción en el UV/Vis se fijó en 60 ms. Se tomó como espectro de referencia, el de la disolución de ferrocianuro potásico a 0.00 V.

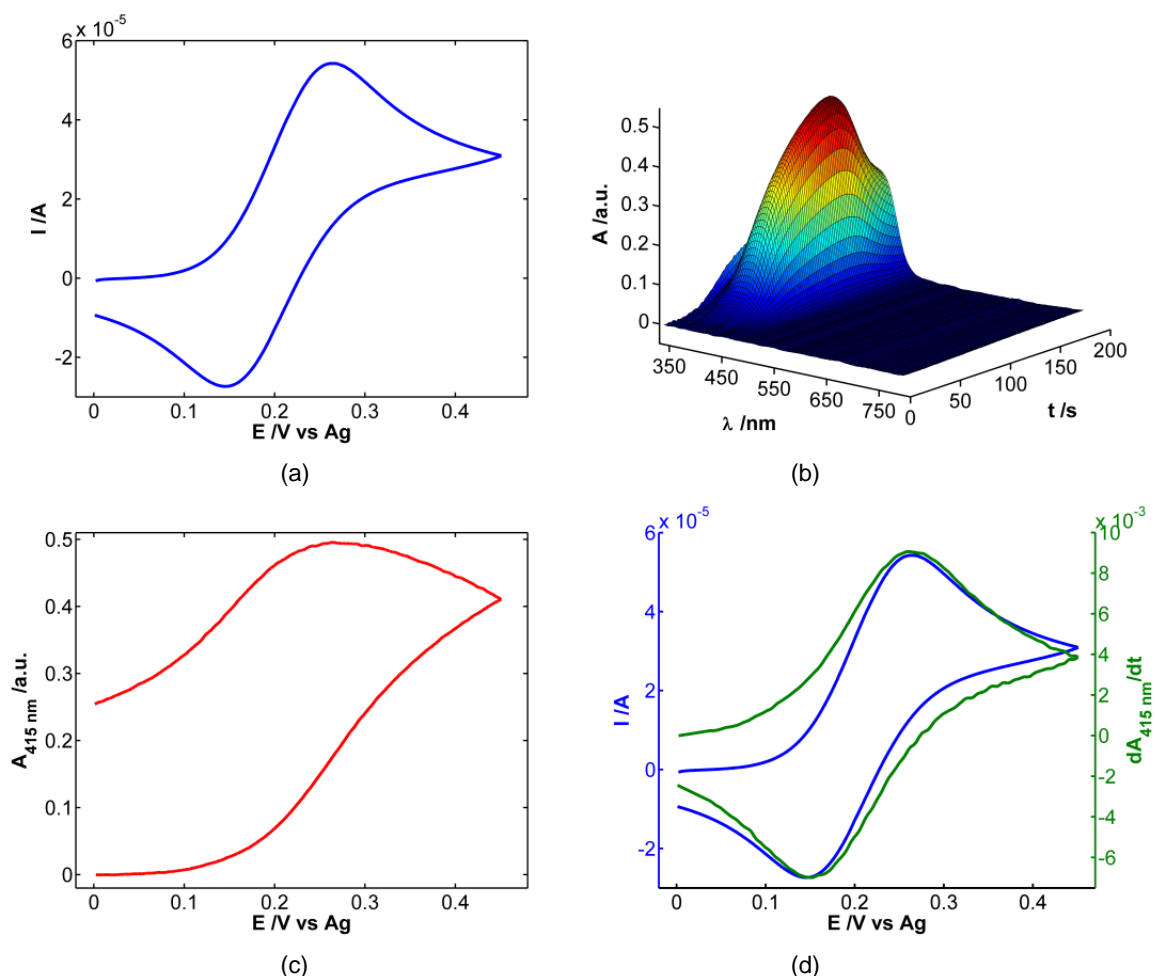


Figura 34. (a) Voltamperograma cíclico, (b) evolución temporal de los espectros (absorbancia-tiempo-longitud de onda), (c) voltabsorciograma a 415 nm, y (d) representación conjunta del voltamperograma cíclico (línea azul) y del voltabsorciograma derivado a 415 nm (línea verde). $C_{\text{ferrocianuro}} = 0.01\text{ M}$; $C_{\text{KNO}_3} = 1.36\text{ M}$; $E_i = E_f = 0.00\text{ V}$; $E_v = +0.45\text{ V}$; $v = 0.005\text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

El voltamperograma mostrado en Figura 34.a presenta un único pico de oxidación centrado en +0.295 V y un pico de reducción a +0.145 V relacionados con la oxidación del ferrocianuro hasta ferricianuro, y su posterior reducción hasta el reactivo inicial. Este proceso lleva asociado un cambio en el espectro de absorción (Figura 34.b) tal y como se observa en la representación de la evolución temporal de los espectros. Evoluciona una banda centrada en 415 nm asociada a la formación de ferricianuro,

banda que disminuye en intensidad durante el barrido de reducción. Realizando un corte a esa longitud de onda, 415 nm, se obtiene el correspondiente voltabsorciograma (Figura 34.c) en el que se aprecia como al finalizar la experiencia no se consigue recuperar el valor inicial de absorbancia, lo que indica que no se ha producido el consumo total de todo el ferricianuro generado. La razón de esa diferencia de absorbancias entre el valor inicial y final es debido a que el experimento se ha realizado en régimen de difusión semi-infinita, condiciones en las que la forma oxidada puede difundir fuera de la interfase electrodo/disolución. Al comparar la señal voltamperométrica con el voltabsorciograma derivado a la longitud de onda del máximo de absorción (Figura 34.d) se puede ver una total coincidencia entre ambas señales, tanto en forma como en posición de los picos anódico y catódico, indicando el correcto funcionamiento de la celda desarrollada.

2.6.1.2 Complejo de rutenio tris(2,2'-bipiridina), Ru(bpy)

El segundo sistema elegido para validar la celda espectroelectroquímica fue el complejo de rutenio (II) tris(2,2' bipiridina), el cual se oxida en una región de potencial más anódica. Para ello se preparó una disolución 4×10^{-4} M del complejo $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})$ en 0.1 M de nitrato potásico. Se realizó una voltamperometría cíclica entre +0.70 y +1.10 V a una velocidad de $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, mientras se registraban espectros en la región UV/Vis cada 200 ms. Se registró como espectro de referencia el de la disolución inicial a +0.70 V.

En este caso en la señal voltamperométrica se aprecia un par de picos situados a +0.920 V el anódico y a +0.845 V el catódico (Figura 35.a), mientras que en la señal absorciométrica se pueden apreciar tres bandas (Figura 35.b). La primera y más intensa con un máximo en 312 nm y la última y más débil centrada en 670 nm se relacionan con la generación del complejo $\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})$. Simultáneamente se aprecia una banda que disminuye en intensidad a 455 nm relacionada con el estado de transferencia de carga metal-ligando ($t_{2g}(\text{Ru}) \rightarrow \pi^*(\text{bpy})$) del complejo $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})$ [212,213]. Seleccionando estas tres longitudes de onda y representándolas frente al potencial, se puede apreciar como su evolución es muy similar, diferenciándose únicamente en la intensidad de la señal, y en si se corresponde con la desaparición del

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

reactivo (455 nm, línea roja, Figura 35.c) o la aparición de la forma oxidada del complejo (312 y 670 nm, líneas rosa y verde respectivamente, Figura 35.c).

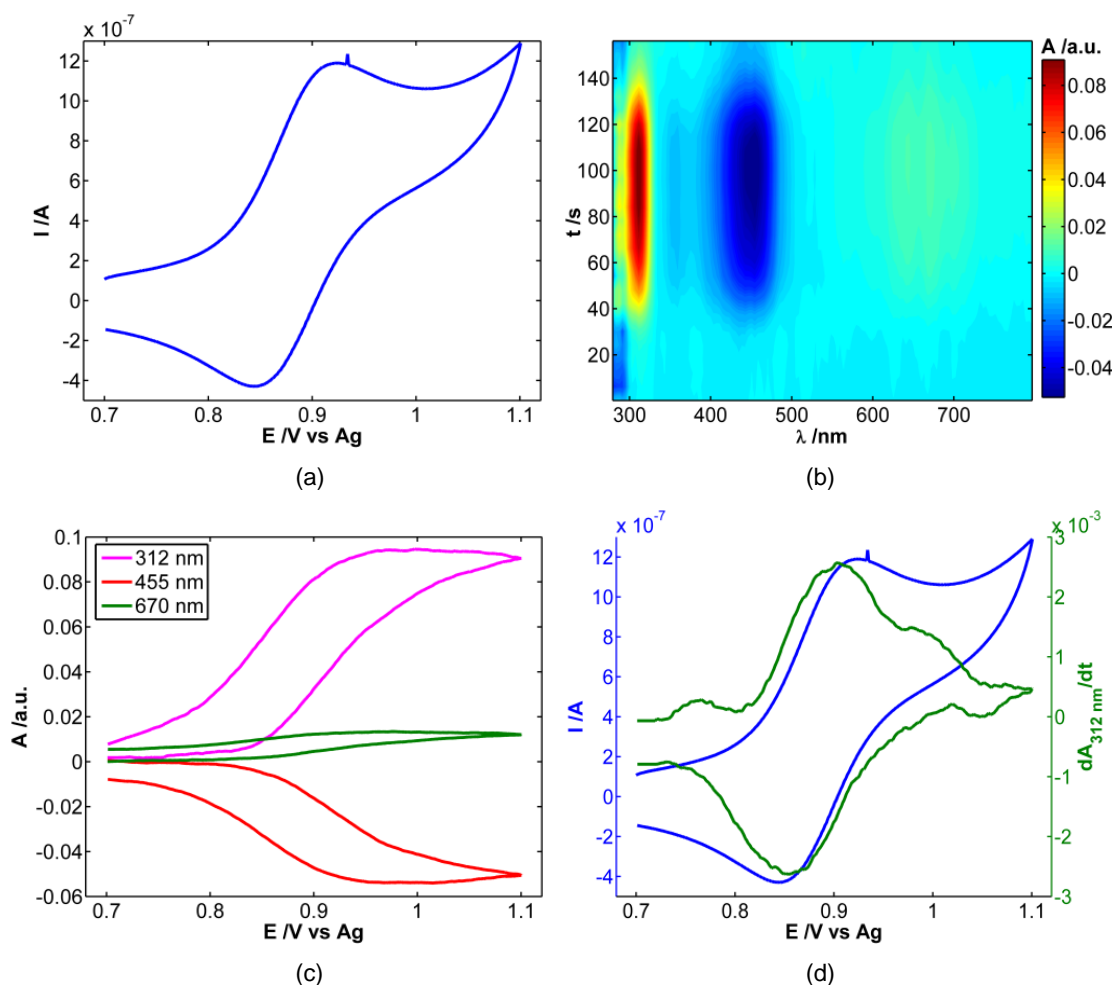


Figura 35. (a) Voltamperograma cíclico, (b) mapa de contorno de la evolución temporal de los espectros (absorbancia-tiempo-longitud de onda), (c) voltabsorciograma a 312, 455 y 670 nm, y (d) representación conjunta del voltamperograma cíclico (línea azul) y del voltabsorciograma derivado a 455 nm (línea verde). $C_{\text{Ru(bpy)}} = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{KNO}_3} = 0.1 \text{ M}$; $E_i = E_f = +0.70 \text{ V}$; $E_v = +1.10 \text{ V}$; $v = 0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Representando la derivada de la absorbancia de la banda más intensa, 312 nm, respecto al tiempo y comparando su evolución con la del voltamperograma (Figura 35.d) se puede concluir que el proceso detectado en los dos equipos es el mismo, la oxidación-reducción reversible del complejo $\text{Ru}^{\text{II}}(\text{bpy})/\text{Ru}^{\text{III}}(\text{bpy})$. La principal diferencia se encuentra en la ausencia de corriente capacitiva en el voltabsorciograma derivado ya que la absorbancia únicamente contiene información con los procesos faradaicos,

no así la señal voltamperométrica. Este resultado demuestra nuevamente el correcto funcionamiento de la celda espectroelectroquímica propuesta para trabajar con electrodos serigrafiados.

2.6.1.3 *Carmín de índigo*

El tercer sistema utilizado para comprobar el adecuado funcionamiento de esta celda ha sido el carmín de índigo, un colorante habitualmente utilizado en la industria farmacéutica y alimentaria. Se utilizó una disolución acuosa 1×10^{-4} M de carmín de índigo en 1 M de ácido sulfúrico, para evitar que se formaran en disolución dímeros de este compuesto en disolución, asegurando que el equilibrio de dimerización estuviera desplazado hacia la forma monomérica [214]. Para estudiar su comportamiento espectroelectroquímico se realizó una experiencia voltamperométrica a $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ iniciando el barrido en +0.20 V en dirección catódica hasta alcanzar un valor mínimo de -0.40 V; en el barrido anódico de vuelta se varió el potencial hasta alcanzar el valor de +0.70 V, terminando la experiencia en el valor inicial de +0.20 V. Durante esta experiencia se realizó el registro simultáneo de los correspondientes espectros de absorción trabajando con un tiempo de integración de 100 ms.

El voltamperograma cíclico registrado presenta un par de picos bien definidos y reversibles en torno a -0.30 V y un pico irreversible a +0.335 V (Figura 36.a), similares a los encontrados en bibliografía [215,216]. Por otro lado la evolución de los espectros muestra la evolución de tres bandas de absorción a 288, 380 y 610 nm (Figura 36.b) tal y como se han observado en algunos estudios espectroelectroquímicos [217]. Los voltabsorciogramas a estas longitudes de onda (Figura 36.c) muestran como en la región entre +0.20 y -0.40 V, donde se aprecia el par de picos reversibles en el voltamperograma, las bandas de 288 y 610 nm disminuyen durante la reducción recuperando prácticamente su valor inicial de absorbancia al recuperar el valor de +0.20 V en el barrido de oxidación. Y, por otro lado, la banda de 380 nm aumenta en intensidad durante la reducción para disminuir posteriormente en el de oxidación y recuperar el potencial de +0.20 V. En la región anódica, en cambio, únicamente se aprecian variaciones de absorbancia a las longitudes de onda de 288 y 610 nm, y al igual que en la región catódica, con variaciones negativas de absorbancia.

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

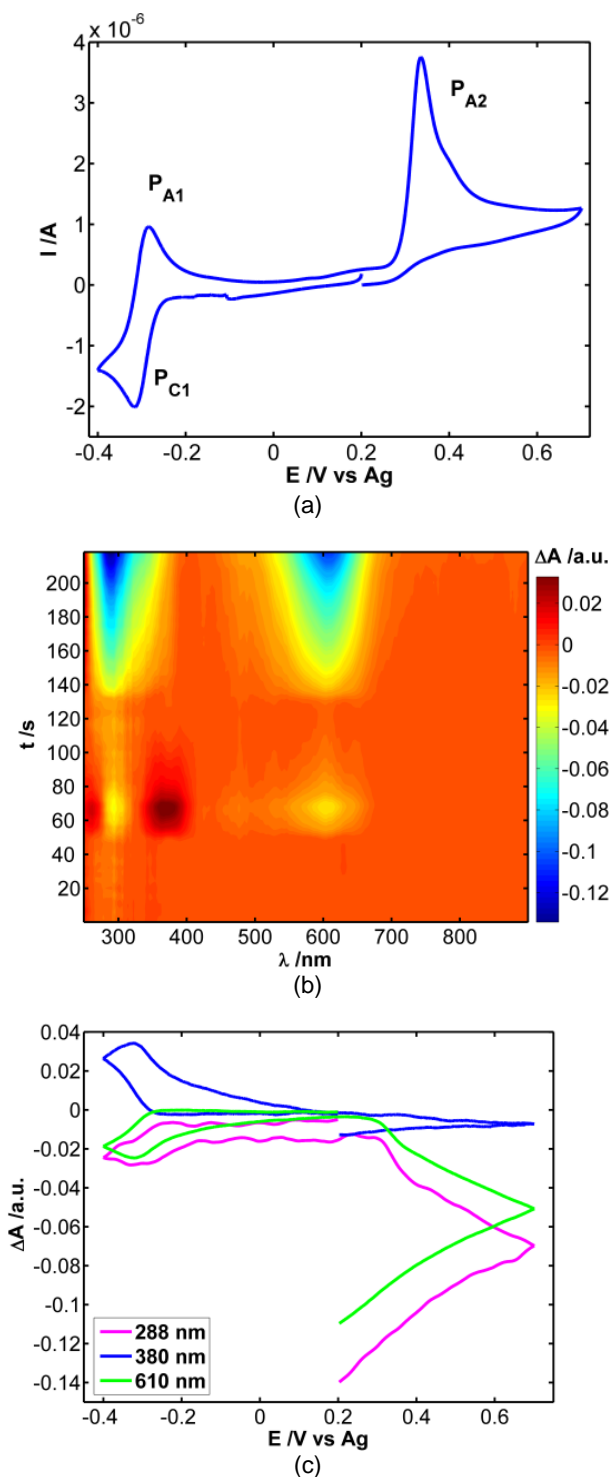
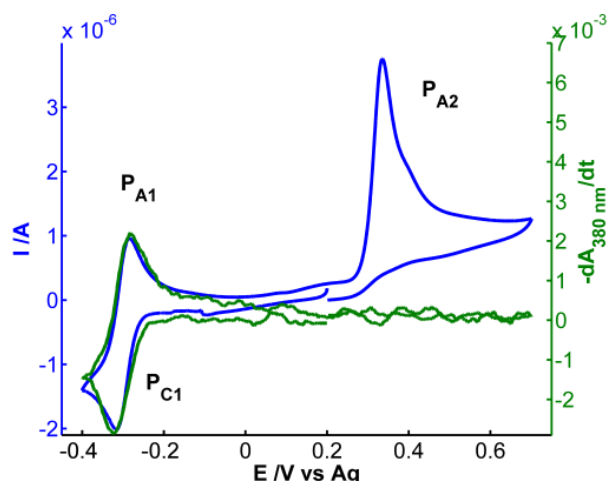
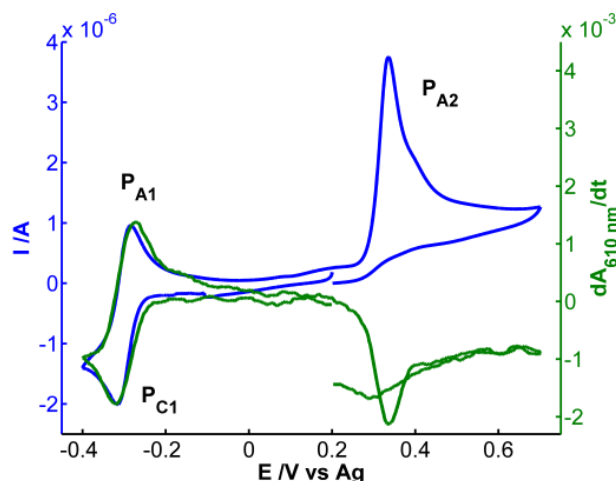


Figura 36. (a) Voltamperograma cíclico, (b) mapa de contorno de la evolución temporal de los espectros (absorbancia-tiempo-longitud de onda), (c) voltabsorciograma a 288, 380 y 610 nm. $C_{\text{carmin de índigo}} = 1 \times 10^{-4} \text{ M}$; $C_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1 \text{ M}$; $E_i = E_f = +0.20 \text{ V}$; $E_{v1} = -0.40$; $E_{v2} = +0.70$; $v = 0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. P_{C1} : pico catódico 1, P_{A1} : pico anódico 1, P_{A2} : pico anódico 2.

La señal derivada de la absorbancia respecto del tiempo de estas tres señales (Figura 37) muestra una gran similitud con el voltamperograma en la región catódica, a potenciales menores de +0.20 V, donde el proceso reversible se observa. En cambio, en la región anódica, donde se aprecia el proceso irreversible, únicamente los voltabsorciogramas a 288 y 610 nm muestran una gran coincidencia con la señal voltamperométrica (Figura 37.b).



(a)



(b)

Figura 37. Representación conjunta del voltamperograma cíclico (línea azul) y del voltabsorciograma derivado (línea verde) (a) a 380 nm, y (b) a 610 nm. $C_{\text{carmin de indigo}} = 1 \times 10^{-4}$ M; $C_{\text{H}_2\text{SO}_4} = 1$ M; $E_i = E_f = +0.20$ V; $E_{v1} = -0.40$; $E_{v2} = +0.70$; $v = 0.01$ V \times s $^{-1}$. P_{C1} : pico catódico 1, P_{A1} : pico anódico 1, P_{A2} : pico anódico 2.

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

El par de picos observados en la región catódica en ambos tipos de señales, voltamperométrica y absorciométrica, se relacionan con un proceso electroquímico reversible bielectrónico en el que el carmín de índigo se reduce hasta carmín de leucoíndigo (Figura 38) a través de los grupos carbonilo que se reducen hasta grupos enol [215,216,218,219]. La explicación de las variaciones negativas de absorbancia a 288 y 610 nm, está en que se ha tomado como espectro de referencia el del carmín de índigo, el cual presenta dos bandas de absorción precisamente en esas posiciones [219]. Por lo tanto, lo que se aprecia a esas dos longitudes de onda en la región catódica es el consumo del carmín de índigo por reducción hasta el carmín de leucoíndigo que presenta un máximo de absorción en 380 nm, y su posterior regeneración, al ser un proceso reversible. La separación de picos en el voltamperograma es de 0.029 V (E_{pC1} a -0.314 V e E_{pA1} a -0.285 V), el valor esperado para un proceso bielectrónico reversible [218].

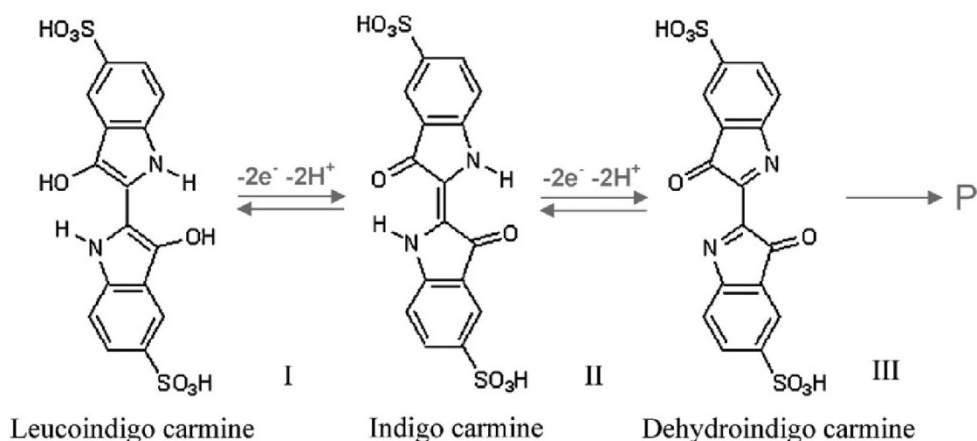


Figura 38. Mecanismo de oxidación-reducción del carmín de índigo [216].

Por otro lado, el pico irreversible observado en la región anódica a +0.335 V corresponde con la oxidación electroquímica del carmín de índigo hasta carmín de dehidroíndigo, proceso nuevamente bielectrónico, a través de los grupos $-NH$ de la estructura indólica del compuesto. El hecho de que no se aprecie pico de reducción se debe a que a la velocidad de barrido (0.01 V/s) y pH elegido (pH = 0) está muy favorecida una reacción química posterior en la que probablemente se produzca la hidrólisis de los grupos imino [216], proceso irreversible químicamente. El mecanismo de reacción para el proceso de oxidación es, por lo tanto, electroquímico-químico (EC)

irreversible [215,216]. Este estudio demuestra que la celda es de gran utilidad también en el estudio de sistemas con mecanismos de reacción complejos, ya que las conclusiones obtenidas en base a estos resultados coinciden con los encontrados en bibliografía.

2.6.1.4 *o*-Tolidina

Por último, para determinar el funcionamiento de la celda con una serie de medidas consecutivas no puntuales, como las mostradas con los sistemas anteriores, se planteó el uso del sistema *o*-tolidina/catión *o*-tolidinio, par redox habitual en el testeo de dispositivos espectroelectroquímicos. Para ello se preparó una disolución de *o*-tolidina 1×10^{-4} M en ácido acético 0.5 M y ácido perclórico 1 M, y se realizaron diferentes barridos voltamperométricos entre +0.05 V y +0.45 V a diferentes velocidades comprendidas entre 0.005 y $0.040 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. Entre una y otra experiencia se renovó la disolución de trabajo en la celda, trabajando en todos los casos con el mismo electrodo serigrafiado de carbono. Previa a cada experiencia se tomó como espectro de referencia el de la disolución de *o*-tolidina al potencial inicial, +0.05 V.

El proceso de oxidación/reducción de este par redox es bielectrónico y reversible electroquímicamente, tal y como muestran los voltamperogramas registrados a las diferentes velocidades de barrido indicadas (Figura 39.a). Se obtiene una relación lineal entre la intensidad de pico anódico y la raíz de la velocidad ($I_P = 2.156 \cdot 10^{-5} \cdot v^{1/2} - 3.984 \cdot 10^{-7}$, $R^2 = 0.9904$), siguiendo la relación marcada por la ecuación de Randles-Sevcik (Ecuación 1), e indicando que el proceso está controlado por la difusión de la *o*-tolidina hasta la superficie del electrodo:

$$I_P = 2.69 \cdot 10^5 \cdot n^{3/2} \cdot S \cdot C \cdot D^{1/2} \cdot v^{1/2} \quad \text{Ecuación 1}$$

Así, conocida el área del electrodo ($S = 0.1257 \text{ cm}^2$), la concentración de la *o*-tolidina ($C = 10^{-7} \text{ mol} \times \text{cm}^{-3}$) y el número de electrones intercambiados ($n = 2$), y utilizando la relación lineal antes obtenida entre I_P y $v^{1/2}$, se puede realizar una estimación del coeficiente de difusión de este compuesto (D). Se obtiene un valor de $5.08 \cdot 10^{-6} \text{ cm}^2 \times \text{s}$, bastante cercano a los valores encontrados en bibliografía [220–222].

2. Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico

Por otro lado los voltabsorciogramas representados a la longitud de onda del máximo de absorción, centrado en 438 nm, muestran cómo cuanto menor es la velocidad de barrido, mayor cantidad de catión *o*-tolidinio se genera, tal y como indican los valores de absorbancia mostrados en la Figura 39.b.

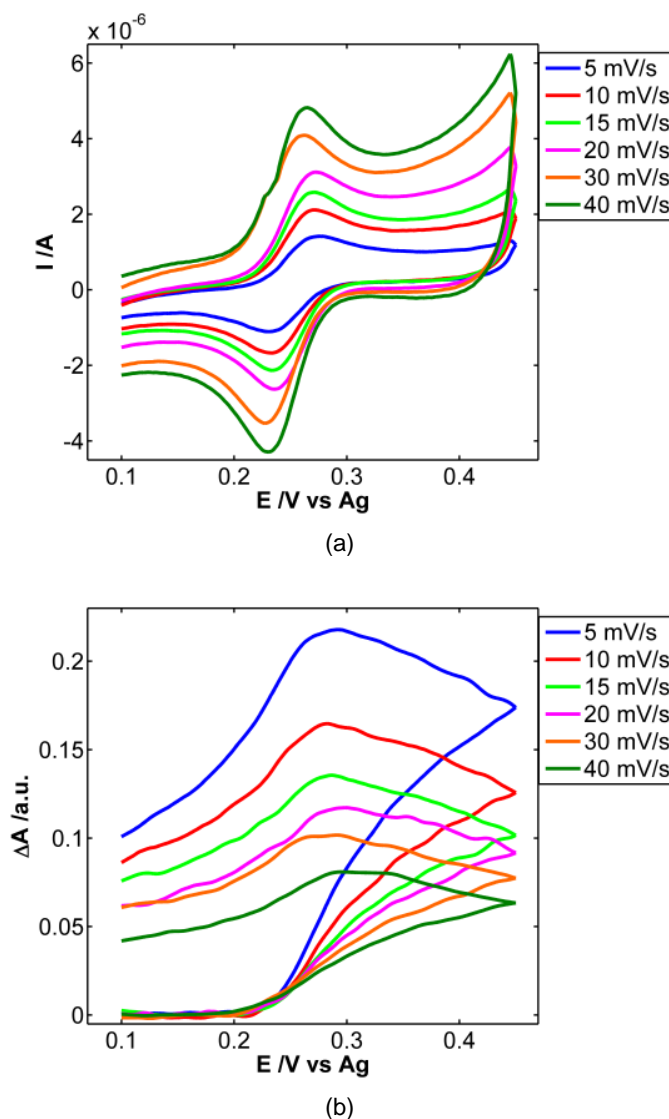


Figura 39. (a) Voltamperogramas cíclicos, (b) voltabsorciogramas a 438 nm a diferentes velocidades de barrido. $C_{o\text{-tolidina}} = 1 \times 10^{-4}$ M; $C_{\text{HClO}_4} = 1$ M; $C_{\text{ácido acético}} = 0.5$ M. $E_i = E_f = +0.10$ V; $E_{v1} = +0.50$; $v = 0.005, 0.01, 0.015, 0.02, 0.03, 0.04$ V \times s $^{-1}$.

En condiciones de electrolisis total, la concentración de la especie absorbente en disolución se puede considerar constante, pudiéndose aplicar en ese caso la ley de Lambert-Beer (Ecuación 2)

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot b \cdot C$$

Ecuación 2

donde A_{λ} es la absorbancia del analito a una determinada longitud de onda (a.u.), ε_{λ} es el coeficiente de absortividad molar ($\text{L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), b el camino óptico recorrido por el haz de radiación (cm) y C la concentración del analito ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$). En las experiencias planteadas para la oxidación de la *o*-tolidina con la celda espectroelectroquímica para electrodos serigrafiados (Figura 31), el camino óptico, coincidente con el espesor de la capa de difusión es el doble de este valor, ya que las experiencias se realizan en reflexión. Por lo tanto, la Ecuación 2 se puede expresar como:

$$A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda} \cdot 2 \cdot b \cdot C$$

Ecuación 3

suponiendo que b es el espesor de la capa de difusión (cm). Por otro lado, en esas mismas condiciones de electrolisis total, la carga total consumida (Q) se puede calcular como indica la Ecuación 4:

$$Q = n \cdot F \cdot V \cdot C$$

Ecuación 4

donde n es el número de electrones consumidos por molécula oxidada o reducida durante la electrolisis, F es la constante de Faraday ($96485 \text{ C} \times \text{mol}^{-1}$) y V es el volumen de disolución (L).

En experiencias espectroelectroquímicas realizadas con una variación lineal del potencial, donde la oxidación o reducción del analito es reversible y está controlada por difusión, existe una semejanza funcional entre la absorbancia de la especie absorbente, consumida o generada en la reacción, y la carga faradaica que pasa por el sistema durante la experiencia [220,223,224]. Así, sustituyendo la Ecuación 4 en la Ecuación 3, y conociendo que $V = S \cdot b$, se obtiene la siguiente relación:

$$A_{\lambda} = \frac{2 \cdot 10^3 \cdot \varepsilon_{\lambda}}{n \cdot F \cdot S} \cdot Q$$

Ecuación 5

Utilizando esta relación con las experiencias realizadas con *o*-tolidina a diferentes velocidades se puede realizar una estimación del coeficiente de extinción molar de su forma oxidada, el catión *o*-tolidinio ($\varepsilon_{\text{catión } o\text{-tolidinio}}$). Eligiendo la región

de potenciales donde el proceso está controlado por la velocidad de transferencia electrónica, y aún la difusión no es el proceso que limita la oxidación de la *o*-tolidina, se realizan regresiones lineales de la absorbancia al máximo de absorción del catión *o*-tolidinio (438 nm) frente a la carga consumida en ese proceso. Así, con los valores de las pendientes obtenidas de las experiencias a diferentes velocidades de barrido se determinó el citado coeficiente de extinción molar a esa longitud de onda ($\epsilon_{438\text{ nm}}^{\text{cation } o\text{-tolidinio}}$), obteniéndose un valor de $60666 \pm 1845 \text{ mol} \times \text{L}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$, muy similar al encontrado en bibliografía [223–225]. Este resultado demuestra de nuevo que la celda espectroelectroquímica y la metodología desarrollada permite también determinar parámetros característicos del sistema estudiado como se ha demostrado con la *o*-tolidina. Con este conjunto de experimentos realizados con diferentes sistemas que en uno u otro sentido se pueden considerar de referencia en espectroelectroquímica se ha visto las posibilidades que tiene la celda espectroelectroquímica diseñada para trabajar con electrodos serigrafiados. Se ha demostrado como con estos sistemas muy conocidos, estudiados y caracterizados en bibliografía se ha llegado a conclusiones o valores de parámetros similares habiendo servido para validar la celda siendo el punto de partida para el trabajo de esta tesis doctoral, el que se utilizará en aplicaciones y sistemas significativamente más complejos.

2.7 ADQUISICIÓN Y TRATAMIENTO DE DATOS

El potenciostato y espectrofotómetro utilizados disponen de software propio para la adquisición y tratamiento inicial de los datos experimentales, pero de forma separada. El primer paso tras cada experiencia fue almacenar los datos generados por el detector espectrofotométrico y el potenciostato en ficheros ASCII con estructura matricial. Con ninguno de los programas que gestionaban los equipos, electroquímico y espectrofotométrico, fue posible tratar, analizar de forma pormenorizada y sacar conclusiones definitivas sobre ningún sistema a partir de los dos tipos de datos registrados, aunque éstos fueron obtenidos de forma sincronizada. La razón principal es que no están preparados para gestionar el gran volumen de datos generados en una sola experiencia espectroelectroquímica.

Para extraer toda la información contenida en cada una de las experiencias espectroelectroquímicas es fundamental correlacionar adecuadamente ambos tipos de datos, los electroquímicos y los espectroscópicos. Para el tratamiento e interpretación de estos resultados se han utilizado dos programas que pueden gestionar grandes volúmenes de datos, así como ayudar a realizar un análisis pormenorizado de los mismos: MATLAB y R [226,227].

MATLAB se utilizó rutinariamente para cargar, tratar y analizar cada conjunto de experiencias, así como realizar la gestión de figuras y gráficos. Para ello se han desarrollado una serie de funciones adaptadas a MATLAB, algunas basadas en funciones previas desarrolladas por el grupo de investigación de Análisis Instrumental de la Universidad de Burgos [228–231], que han facilitado y simplificado el análisis de grandes set de datos. Entre las diversas funciones implementadas cabe destacar las que permiten cargar los datos generando las matrices de datos adecuadas para cada experiencia espectroelectroquímica, las que permiten filtrar y/o derivar las diferentes señales electroquímicas y espectroscópicas, las que permiten calcular diferentes parámetros característicos de cada señal, así como las que permiten generar gráficos con información visible y fácilmente interpretable.

El análisis estadístico de los datos espectroelectroquímicos, en cambio, se realizó habitualmente con el programa R que proporciona un amplio abanico de herramientas estadísticas (modelos lineales y no lineales, tests estadísticos, análisis de series temporales, algoritmos de clasificación y agrupamiento, análisis multivariante así como regresión multivariante, etc.). Así, en parte de este trabajo el programa R se ha utilizado para realizar regresiones lineales utilizando *Ordinary Least Squares Regression* (OLSR) y regresiones robustas de los datos para los diferentes calibrados realizados. En el primer caso, se ha estudiado la relación matemática entre una variable dependiente, la concentración del analito estudiado, y diferentes variables independientes, tanto electroquímicas (intensidad de pico) como espectroscópicas (máximos de absorción, intensidad de pico de las señales absorciométricas derivadas, etc.). Además, se realizaron regresiones robustas previas a las regresiones lineales para detectar puntos anómalos en las curvas de calibrado realizadas. Por otro lado, se debe recordar que un experimento espectroelectroquímico nos suministra multitud de

espectros de absorción en la región UV/Vis del espectro a lo largo de una experiencia electroquímica. Es decir, conseguimos tener a los diferentes potenciales aplicados al sistema un espectro completo entre aproximadamente 200 y 1000 nm. Es bien sabido, que en la región UV/Vis del espectro las bandas de absorción son muy anchas incluyendo en muchas ocasiones información sobre más de una especie. Por esta razón, se ha decidido en muchos de los análisis estadísticos realizados en este trabajo llevar a cabo un análisis multivariante de los datos, para así, poder extraer la información más directamente relacionada con el analito objeto de análisis, separando la información relativa a productos secundarios de reacción. Este análisis multivariante, nos ha permitido en otras ocasiones incluso identificar alguno de esos sub-productos de reacción lo que ha llevado a comprender mejor el correspondiente mecanismo de reacción.

Entre las herramientas de análisis multivariante utilizadas se encuentra en primer lugar, *Partial Least Squares Regression* (PLSR) [232–234], que combina los fundamentos del *Principal Component Analysis* (PCA) y la regresión múltiple. Ha demostrado ser muy útil cuando se trabaja con un conjunto de variables independientes muy grande, llamados predictores, y se pretende predecir un conjunto de variables dependientes claramente menor. En todos los casos presentados en esta tesis el número de variables predictoras, normalmente longitudes de onda, es significativamente superior al de variables dependientes o número de muestras estudiadas, pudiéndose dar problemas de multicolinealidad, es decir, de dependencia lineal entre las variables predictoras. Es precisamente en estos casos, cuando PLSR es especialmente eficaz. Este método actúa transformando las variables predictoras en componentes ortogonales llamadas “vectores latentes” no correlacionadas entre sí, de forma que expliquen la mayor covarianza posible entre la matriz de variables predictoras (X) y la matriz de variables dependientes (Y). Es decir, extrae las componentes de X más relevantes para explicar Y de este modo se consigue por una parte resolver el problema de multicolinealidad y, por otra parte, reducir la dimensionalidad del espacio de estas variables predictoras. Finalmente, el proceso termina con la etapa de regresión en la que se utiliza los vectores latentes o componentes de PLS para predecir las matriz de variables dependientes (Y).

Con el objetivo de buscar las variables que más pesan en una señal multivariante, se puede usar también otras herramientas estadísticas como *Independent Component Analysis* (ICA) [235–237]. Este método matemático se basa en suponer que la respuesta es un conjunto de señales o variables no-gaussianas e independientes estadísticamente hablando. De este modo se consigue separar y extraer a ciegas la estructura fundamental de un conjunto de datos, con la información más representativa del sistema estudiado, algo extremadamente útil en problemas de los que se tiene muy poca información. Una de sus limitaciones es que no suministra información directa sobre la composición de un sistema, pero la que suministra sí que indica los principales componentes del mismo. Existen varias diferencias entre el Análisis por Componentes Principales (PCA) e ICA. En primer lugar, para utilizar PCA se debe asumir que las señales son gaussianas, lo que implica que las componentes extraídas con este modelo podrían ser a su vez combinación lineal de al menos otras dos variables independientes. Por otro lado, en ICA no hay un orden de magnitud asociado a cada una de las componentes encontradas, es decir, que la primera componente no tiene porqué ser la que más peso tiene en la respuesta. Y, por último, las componentes extraídas con ICA no varían con el signo positivo o negativo. Esta herramienta se ha utilizado en el estudio de experiencias en las que se sospechaba por la forma de la señal electroquímica y/o espectroscópica que más de un compuesto químico participaba en la reacción de oxidación/reducción estudiada.

Previamente al uso de PLS se utiliza el algoritmo MCR-ALS (*Multi Curve Resolution – Alternating Least Squares*) que mejora en cada iteración el ajuste del modelo. Si el algoritmo converge a un mínimo global (caso ideal) se encuentra la solución por mínimos cuadrados, como es el caso. Un punto negativo es el tiempo requerido para estimar los modelos, especialmente cuando el número de variables es elevado lo que repercute en un gran incremento de iteraciones hasta alcanzar la convergencia y en un obstáculo en la detección de muestras anómalas (outliers).

En cuanto al segundo método utilizado en el análisis de nuestros datos fue PARAFAC (*PARAllel FACtor Analysis*) el cual se basa en la descomposición de matrices de datos tridimensionales, resolviendo curvas en tres sub-matrices

bidimensionales, lo que le hace adecuado para tratar complejos de gran número de datos obteniendo información fehaciente y real [137–139].

En la descomposición que realiza PARAFAC cada componente viene definida por tres vectores de loadings que representan el comportamiento de los mismos en cada una de las tres dimensiones. PARAFAC es un modelo más simple que PLS pero más restrictivo, lo cual le hace que sea apropiado para casos diferentes en los que la cantidad de datos requiera restricciones más fuertes para poder obtener información de la matriz [140]. PARAFAC también requiere del algoritmo ALS para ayudarle a determinar las componentes del sistema aplicando restricciones a la convergencia mejorando el ajuste, idéntica base que para PLS, siempre se busca el mínimo de convergencia y para lograrlo se requiere de una iniciación apropiada que en este trabajo se realizó con ICA.

Sin embargo, en PARAFAC a veces pueden darse pequeños cambios en el ajuste que pueden estar relacionados con grandes diferencias en los loadings. Para evitar esto, se utilizan criterios de parada en la convergencia de ALS siendo uno de los más comunes la detención de las iteraciones cuando el cambio relativo en el ajuste entre iteraciones es inferior a un cierto valor.

Es posible hacer una comparación entre ambos métodos estableciendo ventajas e inconvenientes de cada uno de ellos. PLS por su parte descompone la matriz en un conjunto de cubos de manera óptima, pudiendo ser el rango superior al número de especies absorbentes. Su principal característica es que los scores tienen máxima covarianza con la parte inexplicada de la variable dependiente.

Por otro lado, su solución es fácil de interpretar, incluso con enormes cantidades de datos, es un algoritmo rápido debido a los pocos parámetros necesarios ya que el problema queda reducido a valores propios, y además permite la estabilización de la solución en caso de baja contribución neta del analito, debido a la incorporación de la variable dependiente en la descomposición.

Sin embargo, con PLS se pierde ajuste en el modelo trilineal en comparación a uno bilineal por no tener restricciones muy severas, de ahí la necesidad de elegir bien el método en función de la naturaleza y cantidad de datos a tratar [136].

PARAFAC destaca principalmente porque presenta unicidad en la solución. Los loadings son calculados sin imposición de ortogonalidad, por lo que los loadings pueden ser asociados a las fuentes que provocan la variación en cada modo, aportando así, mayor información visual que los scores o loadings obtenidos con otros métodos estadísticos.

Además, PARAFAC permite trabajar con más de tres dimensiones, lo que le hace presentar un gran beneficio en aquellos problemas tediosos en los que las matrices de datos son intratables con otras aplicaciones. Pero también tiene sus desventajas, como la libertad rotacional que hace que los componentes deban ser identificados después de la construcción del modelo. Pero la más importante a tener en cuenta para conseguir que PARAFAC proporcione resultados fiables y robustos es que la estructura de los datos a tratar debe ser obligatoria y absolutamente trilineal.

Gracias a estas herramientas estadísticas podemos obtener otro dato importante para el tema que nos ocupa, como es el *límite de detección* o nivel mínimo de la sustancia estudiada para que el método la pueda detectar con certeza razonable. El método puede ser capaz de detectar los niveles más bajos de la sustancia química, pero a esos niveles tan bajos, la probabilidad de un resultado positivo falso puede llegar a ser inaceptable. Esto ocurre porque todos los métodos de prueba tienen una cierta variación aleatoria en sus resultados, por lo tanto, cuando se prueba una muestra que no contiene ninguno de los analitos, la prueba puede demostrar que también tiene una cantidad muy pequeña del mismo. Por esta razón, los resultados muy bajos no se toman en cuenta. La línea en la que es difícil distinguir entre los verdaderos positivos y los aleatorios dispersos es el límite de detección.

Los programas se implementaron en Matlab 7.0 de The Mathworks Co. [141] que utiliza un lenguaje de alto nivel capaz de manejar de modo sencillo los volúmenes de información adquiridos en cada experiencia. El volumen de información que se genera es muy grande, siendo poco manejables las matrices de datos obtenidas con los programas de tratamiento de datos convencionales.

Los puntos característicos de Matlab son los siguientes:

- ✓ Los cálculos vectoriales de la matriz de datos son muy eficientes y precisos.

2. *Diseño, construcción y validación del dispositivo espectroelectroquímico*

- ✓ Los gráficos son sencillos de crear e identificar.
- ✓ Se pueden integrar un elevado número de herramientas con las que tratar distintos procesos e interpretarlos.
- ✓ Se pueden desarrollar aplicaciones utilizando el lenguaje de Matlab.
- ✓ El lenguaje de programación de Matlab es versátil en muchos campos, gracias a sus características de cálculo vectorial, numérico y al algoritmo del software. La primera y principal aplicación es dar solución a algunos de los problemas más complejos de los sistemas de ecuaciones. Otra de sus aplicaciones más considerables es la estimulación del software, ya que el resto son aplicaciones más triviales, como el análisis gráfico, visualización y exploración.

El grupo de programas creado para el correcto tratamiento de los datos espectroelectroquímicos permite realizar todas las transformaciones necesarias para la posterior interpretación de los diversos fenómenos que hayan podido suceder.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 ESTUDIO ESPECTROELECTROQUÍMICO DE DOPAMINA

3.1.1 ESPECTROELECTROQUÍMICA DE LA ELECTRO-OXIDACIÓN DE DOPAMINA.

El estudio del mecanismo de oxidación de la dopamina en medio neutro se abordó utilizando técnicas espectroelectroquímicas de absorción en el UV/Vis. Para ello se realizaron una serie de experiencias realizando barridos voltamperométricos entre -0.50 V y +0.70 V, analizando el efecto que tenían la concentración de dopamina y la velocidad de barrido en las respuestas espectroelectroquímicas.

Para analizar el efecto de la concentración en el proceso de oxidación de la dopamina se eligieron dos concentraciones representativas de este neurotransmisor, 1.0×10^{-3} M y 6.0×10^{-3} M, preparadas en un medio tamponado, disolución tampón fosfato (0.5M PBS) con un pH de 7. Se realizaron barridos voltamperométricos entre -0.50 V y +0.70 V a una velocidad de barrido de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, registrando simultáneamente la señal electroquímica y la señal espectral entre 250 y 900 nm.

El voltamperograma lineal registrado durante el barrido anódico en este rango de potenciales muestra un único pico de oxidación relacionado con el proceso de oxidación de la dopamina presente en el medio de reacción (Figura 40.a). Se aprecia claramente como la intensidad de pico del voltamperograma obtenido con la disolución 6.0×10^{-3} M es mayor que la del voltamperograma de la disolución más diluida, pero no seis veces mayor como cabría esperar sino únicamente 3.8 veces. Además se observa como el potencial *onset* es menor para la disolución más concentrada, +0.04 V para 6.0×10^{-3} M y +0.10 V para 1.0×10^{-3} M. En cambio, el potencial de pico es significativamente mayor para la disolución más concentrada, +0.43 V para 6.0×10^{-3} M y +0.28 V para 1.0×10^{-3} M. Representando normalizados estos dos voltamperogramas (Figura 40.b) se puede apreciar, como el aumento de corriente es mucho más acusado en la disolución más diluida que en la de 6.0×10^{-3} M. Todas estas evidencias llevan a pensar que el mecanismo de oxidación de la dopamina es complejo, donde están implicadas diferentes especies según sea la concentración inicial de dopamina.

3. Resultados y discusión

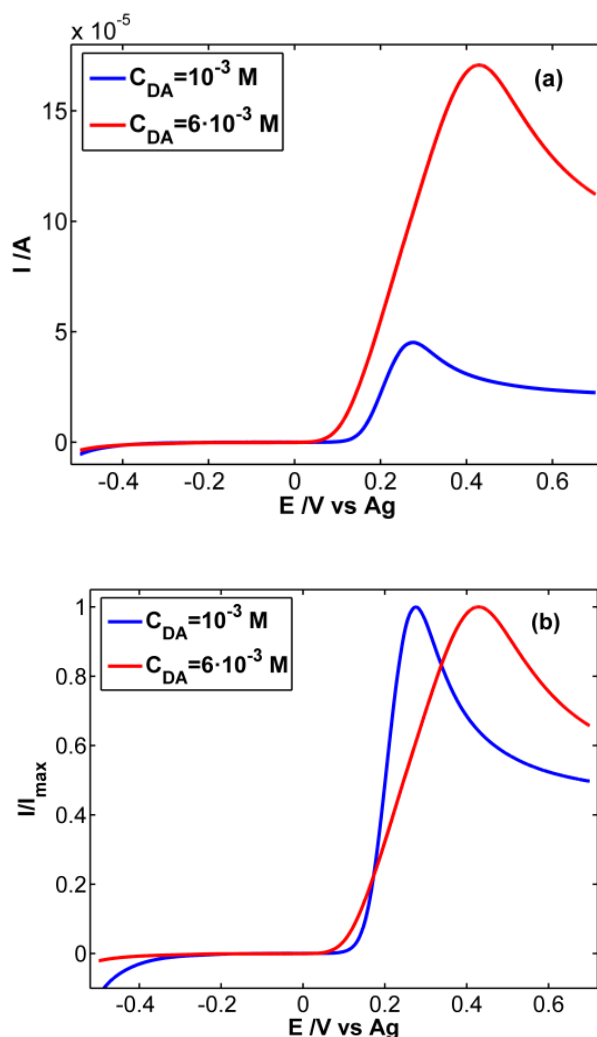


Figura 40. Voltamperograma lineal de oxidación de dopamina a dos concentraciones: $1.0 \times 10^{-3} M$ y $6.0 \times 10^{-3} M$. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = -0.50 V$, $E_{final} = +0.70 V$, velocidad de barrido (v) = $0.05 V \times s^{-1}$. (a) señales originales, y (b) señales normalizadas.

Las señales espectrales registradas durante estas dos experiencias espectroelectroquímicas muestran espectros de absorción y una evolución de los mismos durante el barrido de potencial claramente diferente según cual sea la concentración de dopamina en el medio (Figura 41). Entre el potencial inicial, -0.50 V, y el potencial de pico, +0.43 V para $6.0 \times 10^{-3} M$ y +0.28 V para $1.0 \times 10^{-3} M$, se puede ver como en ambos casos los espectros son muy similares, diferenciándose básicamente en la intensidad de la señal, mayor cuanto mayor es la concentración inicial de dopamina. En los dos espectros, líneas verdes y rojas en Figura 41.a y Figura

41.b, hay dos bandas de absorción centradas en 300 y 395 nm. Estas dos bandas se atribuyen a una transición interligando $\pi \rightarrow \pi^*$ derivada de la transición $1L_b \leftarrow 1A_1$ de la dopamina, típica de una semiquinona [34,117], y a una transición $n \rightarrow \pi^*$ relacionada con el grupo carbonilo unido al anillo bencénico característico de la o-quinona [117,153], respectivamente. Un primer análisis de las señales a los dos potenciales de pico, diferentes según la concentración de dopamina utilizada, muestra que la única diferencia significativa es la intensidad neta del espectro de absorción. La banda situada en 395 nm está relacionada con el primer producto de oxidación de dopamina, la dopaminoquinona (DAQ), Figura 42.

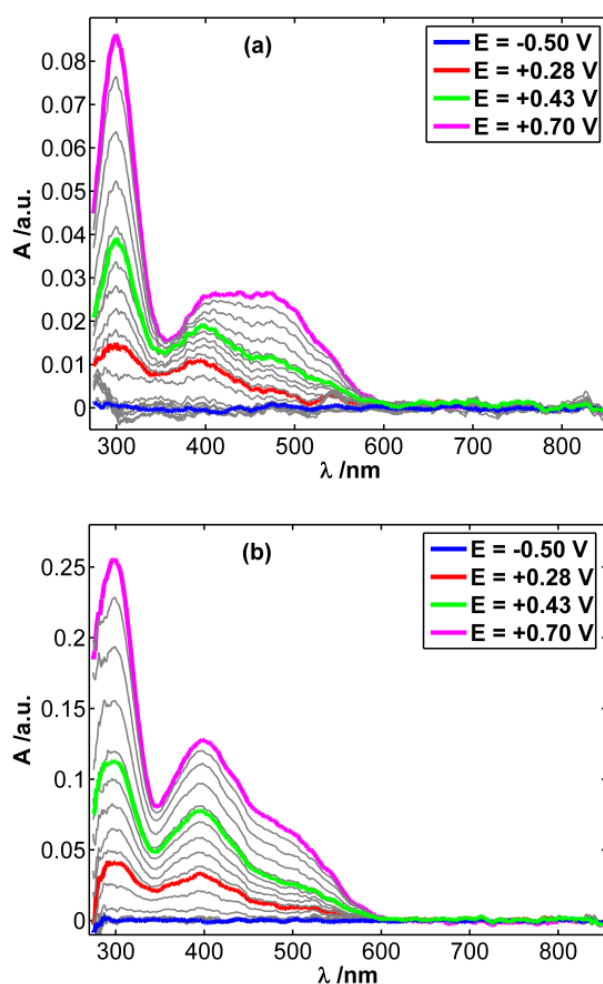


Figura 41. Evolución de los espectros de absorción en el UV/Vis durante el barrido de oxidación: (a) 1.0×10^{-3} M, (b) 6.0×10^{-3} M. $E_{\text{inicial}} = -0.50$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

3. Resultados y discusión

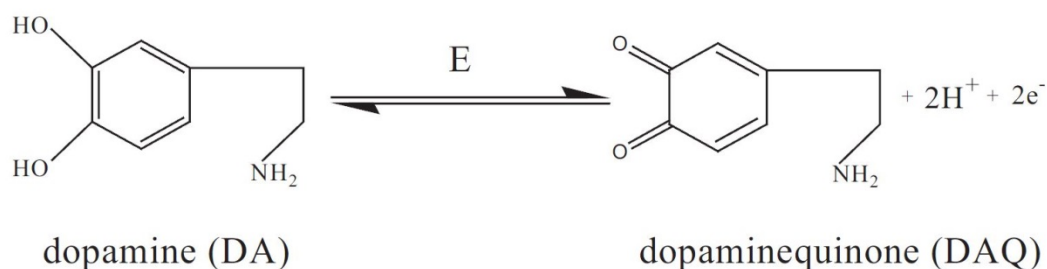


Figura 42. Reacción de oxidación de la dopamina hasta DAQ [152].

Analizando los espectros de absorción al final del barrido, y por lo tanto su evolución entre +0.43 V y +0.70 V, se evidencian cambios no observados en el primer tramo del barrido anódico (Figura 41.a y Figura 41.b). Los espectros registrados para la disolución de dopamina 1.0×10^{-3} M muestran como la banda centrada en 395 nm sigue creciendo pero más lentamente, mientras que entre 460-480 nm emerge una nueva banda que aumenta a una velocidad muy superior a lo que lo hace la de 395 nm.

En cambio, los espectros registrados para la disolución de dopamina 6.0×10^{-3} M, muestran como ambas bandas, la de 395 y la nueva entre 460 y 480 nm, crecen aproximadamente a la misma velocidad. Esta nueva banda, que emerge entre 460 y 480 nm, está relacionada con la transición $n \rightarrow \pi^*$ relacionada con el grupo carbonilo unido al anillo bencénico del producto de oxidación en el que se ha producido un reacción de ciclado intramolecular para dar el leucodopaminocromo, el cual en el rango de potenciales analizados se encuentra oxidado en forma de dopaminocromo (DAC) [152–154], Figura 43.

Por otro lado, la banda centrada en 300 nm, sigue aumentando su intensidad hasta el final del barrido anódico. Analizando la relación entre los valores de absorbancia a 300 (A_{300}) y 395 nm (A_{395}), para las dos concentraciones de dopamina estudiadas se puede comprobar que cuanto mayor es la concentración de dopamina mayor es la relación (A_{395}/A_{300}), Figura 44.a, en el rango de potenciales comprendido entre +0.25 y +0.70 V. Esto indica que la concentración de DAQ electrogenerada es mayor cuando mayor es la concentración de dopamina en disolución. Además, esta relación de absorbancias disminuye al aumentar el potencial aplicado lo que quiere decir que la DAQ se va transformando según se genera en otro subproducto, que

también absorbe a 300 nm. Esta disminución es lineal para la disolución más concentrada de dopamina, 6.0×10^{-3} M, mientras que para la disolución más diluida la disminución es más brusca entre +0.25 y +0.40 V. Es decir, la transformación de la DAQ generada en DAC tiene lugar a mayor velocidad en la disolución de dopamina 1.0×10^{-3} M que en la más concentrada. Por otra parte, estudiando la relación entre la absorbancia a 470 y 300 nm (A_{470}/A_{300}), Figura 44.b, se puede comprobar como tiene un valor prácticamente constante para ambas concentraciones. Esto se puede interpretar como que estas dos longitudes de onda están relacionadas mayoritariamente con la misma especie, en este caso el DAC, subproducto de oxidación de la dopamina.

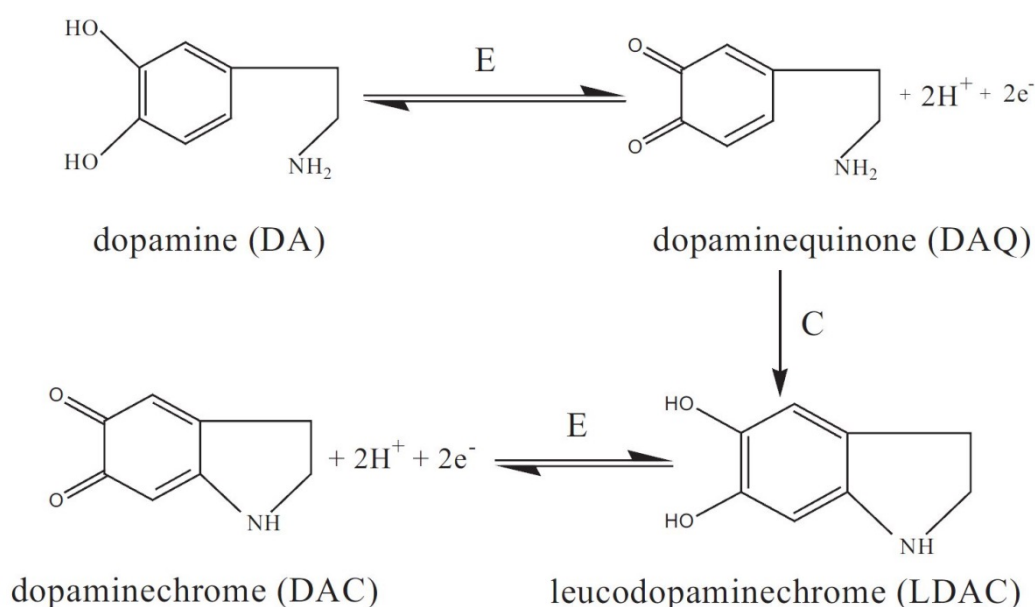


Figura 43. Reacción de oxidación de la dopamina hasta dopaminocromo [152].

Finalmente, si normalizamos con respecto al máximo de absorción el espectro de absorción registrado a diferentes valores de potencial se puede visualizar cualitativamente la cantidad relativa de ambos productos de oxidación generados (Figura 44.c y Figura 44.d). Por ejemplo, eligiendo el potencial de pico del voltamperograma de la disolución 1.0×10^{-3} M de dopamina, +0.28 V, (Figura 44.c), se puede ver como ambos espectros normalizados son iguales, indicando que a ese potencial únicamente se ha formado DAQ, y en cantidades relativas equivalentes, independientemente de la concentración inicial de dopamina. En cambio eligiendo el

3. Resultados y discusión

potencial final del barrido de oxidación, +0.70 V, (Figura 44.d), se puede concluir, atendiendo a estos valores relativos de absorbancia, que la cantidad relativa de DAC generada es la misma para ambas disoluciones de dopamina al ser iguales los espectros de absorción a longitudes de onda superiores a 460 nm. No así la cantidad de DAQ, que es significativamente mayor cuanto mayor es la concentración inicial de dopamina, 6.0×10^{-3} M, aspecto reflejado en el mayor valor de absorbancia relativa a 395 nm. Es decir, a mayor concentración de dopamina se genera mayor cantidad del producto de oxidación reversible, DAQ, pero una cantidad equivalente del producto de oxidación irreversible, DAC.

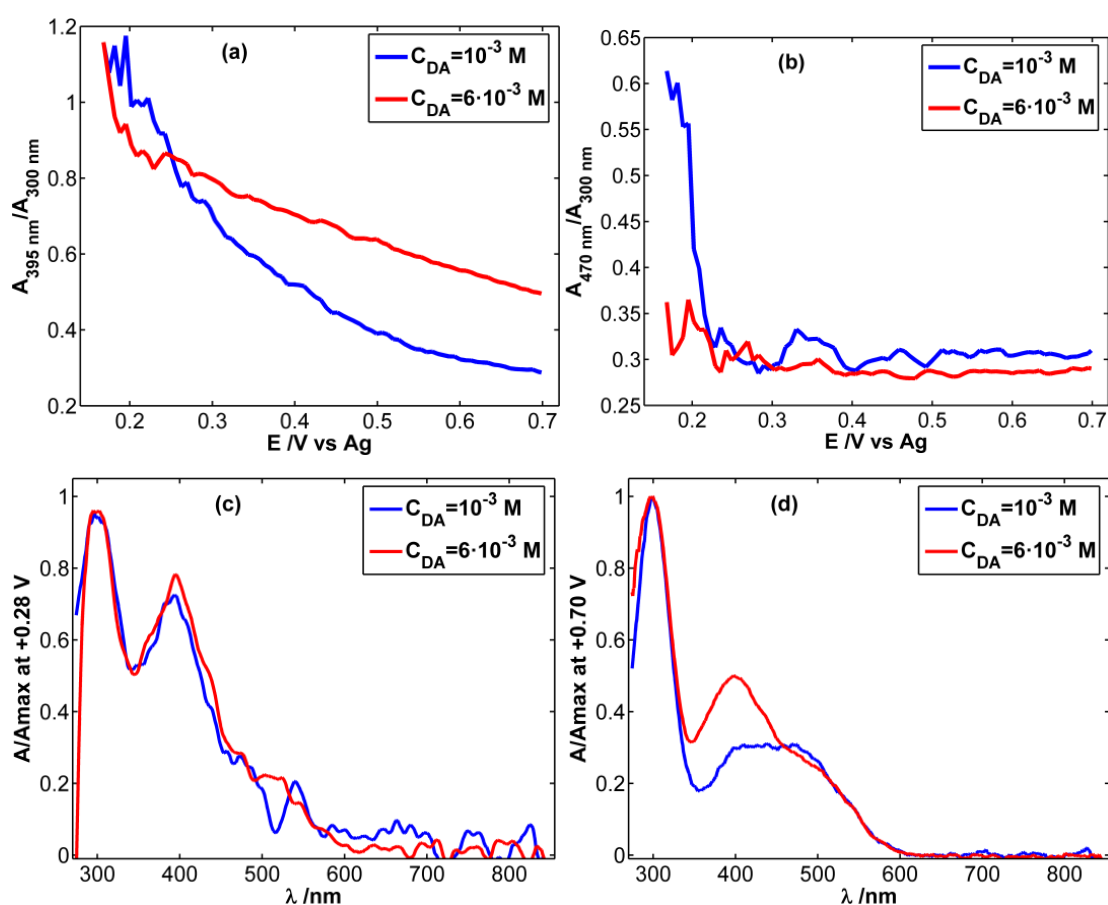


Figura 44. Evolución con el potencial de la relación entre la absorbancia (a) a 395 y 300 nm. (b) a 470 y 300 nm, para las dos disoluciones de dopamina de concentración 1.0×10^{-3} M y 6.0×10^{-3} M. Espectros de absorción normalizados a (c) +0.28 V y (d) +0.70 V para las dos concentraciones. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.50$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

Estos hechos experimentales se pueden interpretar como que la reacción electroquímica reversible de oxidación de dopamina hasta DAQ (Figura 42) es más rápida que la química irreversible de ciclado interno que provoca la aparición en el medio de reacción de DAC (Figura 43). De modo que cuando inicialmente la concentración de dopamina es muy alta, se genera en una concentración también elevada DAQ, pero la reacción química posterior al ser más lenta que la electroquímica tarda en consumir esa DAQ generada y transformarla hasta DAC. Por esa razón, en la disolución de dopamina 6.0×10^{-3} M está más marcada la banda de 395 nm relacionada con la DAQ que la de 470 nm vinculada al DAC, no así en la disolución de dopamina 1.0×10^{-3} M.

A la vista de estos resultados se puede concluir que cuanto mayor es la concentración de dopamina, la ciclación intramolecular y la posterior oxidación son dificultadas durante la primera etapa de oxidación, haciendo que el espectro de absorción de la DAQ domine en la respuesta espectral.

Como ya se ha comentado en el apartado 1.3.1 de esta memoria (Figura 11 y Figura 12), la reacción de oxidación de la dopamina y las señales electroquímicas registradas, cuando se realizan varios ciclos de oxidación consecutivos, evidencian cambios en la reacción y en la superficie del electrodo. Con el fin de evaluar espectroelectroquímicamente estos cambios se realizaron una serie de experiencias en las que se llevaban a cabo tres barridos de potencial consecutivos entre -0.50 V y +0.70 V a una velocidad de barrido de potencial de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, trabajando con las dos concentraciones de dopamina utilizadas hasta ahora, 1.0×10^{-3} y 6.0×10^{-3} M.

Dados los diversos compuestos que pueden formarse durante la oxidación de dopamina, y con el fin de identificar a partir de su espectro específico estos compuestos, se realizó un tratamiento multivariante de los datos usando en primer lugar *Independent Component Analysis* (ICA) [235–237] con el fin de discriminar las variables que más pesan. A continuación, esa primera aproximación sirvió como punto de partida para el análisis con el algoritmo MCR-ALS (*Multiple Curve Resolution-Alternating Least Squares*) que consigue mejorar el ajuste del modelo tras cada iteración. El procedimiento concluye cuando el algoritmo converge a un mínimo global

3. Resultados y discusión

(caso ideal), que coincide con el punto en el que se encuentra la solución del sistema por mínimos cuadrados, deconvolucionando la señal original en las diferentes componentes que incluye.

En ICA, los criterios de partida fueron seleccionar únicamente dos componentes, ya que se prevé que los compuestos mayoritarios sean DAQ y DAC. Una vez realizada la aproximación inicial, con esa primera deconvolución de los espectros se realizó el análisis con MCR-ALS. En esta segunda etapa se impuso el criterio de no electronegatividad de los valores de concentración y absorbancia ya que los espectros corresponderían a especies generadas durante la oxidación de dopamina, cuyo espectro de absorción aumenta al tomar como espectro de referencia el de la dopamina inicial, y el criterio de normalizar las señales.

La Figura 45 muestra los resultados tras realizar el análisis multivariante con MCR-ALS y deconvolucionar en sus dos componentes principales los espectros registrados en las dos experiencias espectroelectroquímicas multicíclicas de oxidación de dopamina en las que se trabajaron con concentraciones de dopamina 10^{-3} y $6 \cdot 10^{-3}$ M.

Los espectros normalizados de estas dos componentes principales (C_1 y C_2) para ambas experiencias, Figura 45.a y Figura 45.b, indican que corresponden a dos especies diferentes. La primera componente (C_1) muestra un máximo de absorción centrado en 390 nm, mientras que la segunda (C_2) lo tiene en 475 nm, pudiéndose relacionar estas dos componentes con la DAQ (C_1) y DAC y otros productos secundarios (C_2).

Por otro lado, los perfiles de concentración de estas dos componentes representadas frente al tiempo (Figura 45.c y Figura 45.d) y el potencial (Figura 45.e y Figura 45.f) presentan evoluciones muy diferentes. El perfil de concentraciones de la componente C_1 muestra como la concentración de este producto de oxidación aumenta durante la oxidación, alcanza un máximo más o menos estable, y disminuye durante el barrido de oxidación, mostrando la forma esperada del voltabsorciograma de una especie que se forma y consume de forma reversible como es el caso de la DAQ, si no tuviera lugar la reacción secundaria de ciclado interno.

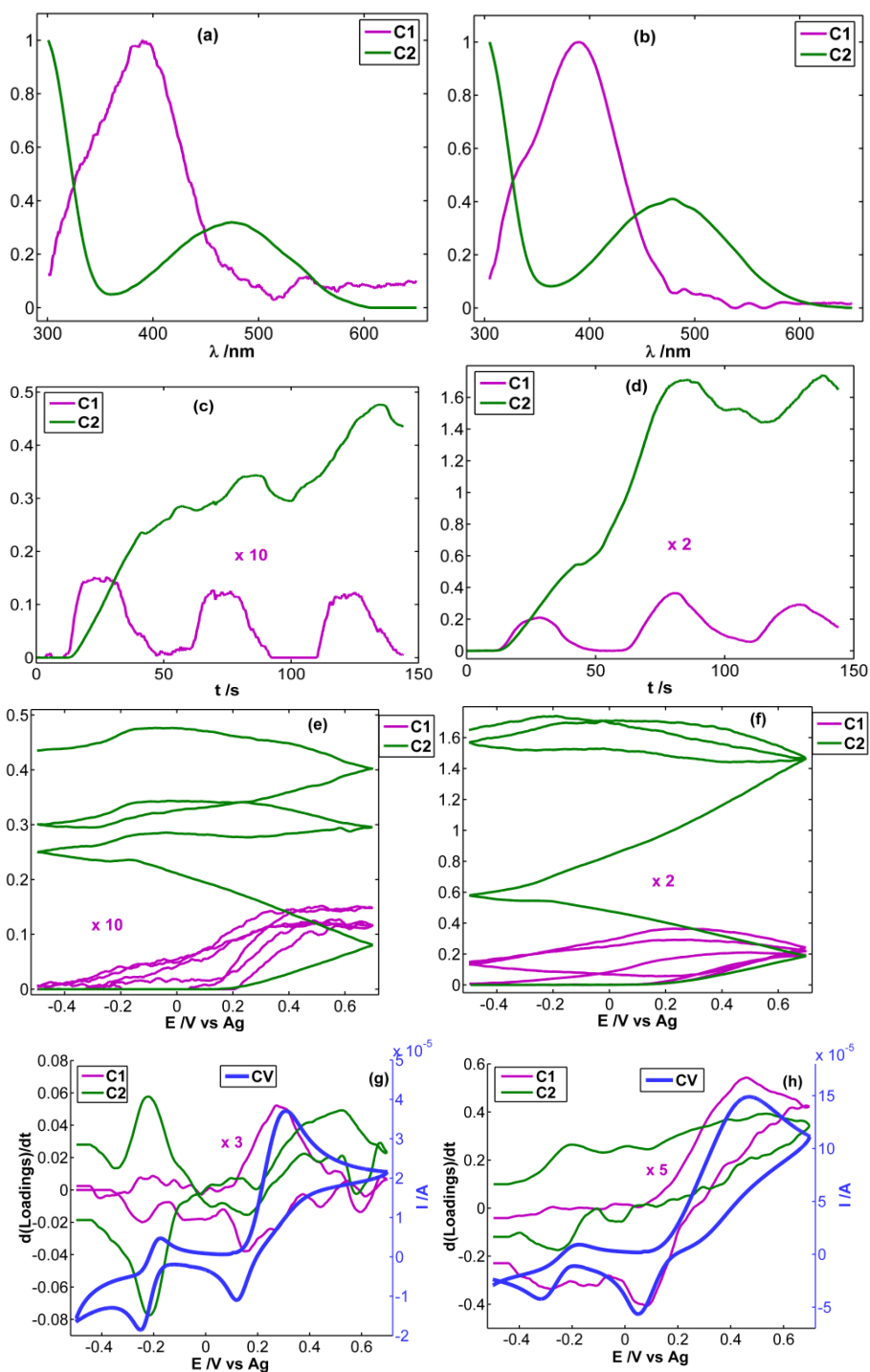


Figura 45. (a, b) MCR-ALS deconvolución espectral de la oxidación de dopamina; (c, d) perfiles de concentración vs tiempo para las especies resueltas por MCR-ALS; (e, f) perfiles de concentración vs potencial para las especies resueltas por MCR-ALS; (g, h) derivada de los perfiles de concentración con el tiempo y voltamperogramas cíclicos registrados durante la oxidación de dopamina entre -0.50 V y $+0.70$ V a una velocidad de 0.05 V \times s^{-1} (3 ciclos). (a, c, e, g) $C_{\text{dopamina}} = 1.0 \times 10^{-3}$ M; (b, d, f, h) $C_{\text{dopamina}} = 6.0 \times 10^{-3}$ M. Todas las disoluciones fueron preparadas en tampón PBS (pH = 7); $t_{\text{integración}} = 135$ ms.

3. Resultados y discusión

Cabe destacar que la cantidad de DAQ generada cuando se trabaja con la concentración de dopamina 1.0×10^{-3} M es significativamente menor (señal multiplicada por un factor de 10 para una mejor visualización en Figura 45.c y Figura 45.e) que cuando se trabaja con la de 6.0×10^{-3} M (señal multiplicada por un factor de 2 para una mejor visualización en Figura 45.d y Figura 45.f). Este resultado se puede interpretar como que cuando se trabaja con concentraciones bajas de dopamina en medio fosfato (pH = 7) se genera DAQ que rápidamente es transformada por ciclación interna en DAC. Solo una pequeña cantidad de DAQ se queda sin transformar, la cual en el barrido de reducción es consumida generando el reactivo inicial, dopamina. En cambio cuando la concentración de dopamina es más alta, 6.0×10^{-3} M, se genera mucha más DAQ, siendo ligeramente más estable en disolución, porque la reacción química secundaria no es capaz de transformar tan rápido toda la DAQ generada en DAC.

Este resultado está de acuerdo con la evolución de la relación de absorbancias A_{395}/A_{300} presentada en la Figura 44.a, donde se puede ver que el consumo de DAQ es más rápida cuanto menor es la concentración de dopamina inicial. En cuanto al perfil de concentraciones de la segunda componente (C_2) se puede ver como para la disolución más diluida de dopamina (Figura 45.c y Figura 45.e) éste aumenta durante los tres barridos de potencial indicando la generación casi continua de DAC. En cambio, para la disolución más concentrada de dopamina, el perfil de concentraciones aumenta mucho durante los dos primeros ciclos de potencial, manteniendo un valor casi constante en el último de ellos. Estas mismas conclusiones se pueden extraer al comparar los perfiles de concentración de las dos componentes extraídas. Así, para la concentración de dopamina 1.0×10^{-3} M, la formación de DAQ finaliza cuando el potencial aplicado está en torno a +0.45 V en el barrido anódico, mientras que la de DAC y otros productos secundarios continua hasta que se alcanza el potencial de -0.20 V en el barrido catódico. Pero, para la concentración de dopamina 6.0×10^{-3} M, la formación de DAQ y DAC es prácticamente idéntica en cuanto al rango de potenciales en que tiene lugar el barrido anódico, de +0.15 V en adelante. La diferencia se encuentra en el barrido catódico, ya que la DAQ se reduce a partir de +0.20 V aproximadamente, mientras la generación de productos secundarios continua hasta

que se alcanza en este barrido catódico el potencial de -0.20 V. Finalmente, comparando las señales derivadas de los perfiles de concentración con los voltamperogramas cíclicos registrados se puede comprobar como cada componente se relaciona con uno de los dos pares de picos presentes en los voltamperogramas. La componente C_1 , vinculada a la DAQ, con el par de picos situados a potenciales mayores de 0.00 V, y la componente C_2 , relacionada con el DAC y otros productos secundarios, con el par de picos observados a potenciales inferiores a 0.00 V.

3.1.2 DETERMINACIÓN ESPECTROELECTROQUÍMICA DE DOPAMINA

La espectroelectroquímica de absorción en el UV/Vis no sólo proporciona información acerca del mecanismo de oxidación de la especie estudiada, en este caso la dopamina, sino que puede suministrar información muy valiosa desde el punto de vista cuantitativo. Con el objetivo de mostrar este potencial de las técnicas espectroelectroquímicas se realizó una serie de experimentos espectroelectroquímicos en los que se varió la concentración de dopamina entre 9.0×10^{-5} hasta 1.0×10^{-3} M, trabajando en todo momento con disoluciones acuosas en tampón fosfato (PBS) con un pH de 7. A la vista de los resultados presentados en el apartado 3.1.1, para estas experiencias se llevaron a cabo voltamperometrías lineales entre 0.00 V y +0.70 V a una velocidad de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, en las que se registró de forma simultánea la evolución de los espectros de absorción en el UV/Vis.

La Figura 46 muestra las dos señales registradas, los voltamperogramas lineales y los espectros de absorción en el potencial vértice, +0.70 V. Se aprecia como el pico de oxidación observado en el voltamperograma y las bandas características del espectro aumentan con la concentración de dopamina. Con estos resultados se puede abordar la determinación de dopamina desde dos perspectivas, la electroquímica utilizando la intensidad de pico como señal respuesta, y la espectroscópica utilizando la intensidad de las bandas características de los productos de oxidación de la dopamina situadas en 305, 395 y 470 nm como señales respuesta. La relación entre la concentración de dopamina y las señales respuestas anteriormente indicadas se analizó en primer lugar a través de una regresión robusta por mínima mediana de cuadrados (LMSR) con la finalidad de detectar datos anómalos. Una vez detectados y

3. Resultados y discusión

eliminados, se construyeron los modelos de regresión por mínimos cuadrados (OLSR) cuyos parámetros característicos se muestran en la Tabla 3.

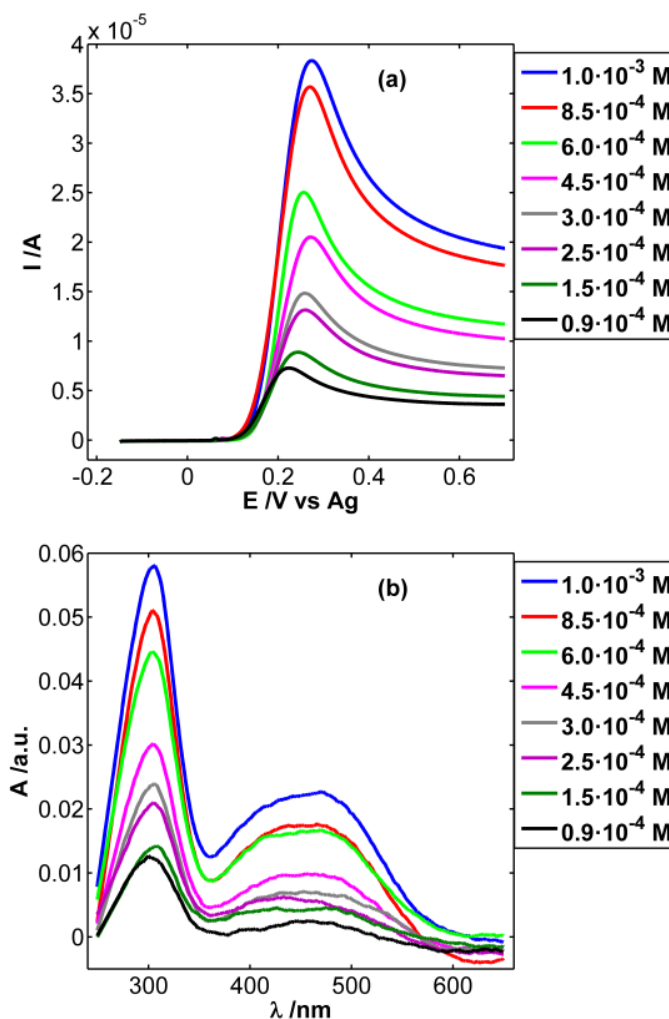


Figura 46. (a) Voltamperogramas lineales y (b) espectros de absorción cuando el potencial aplicado es de +0.70 V. $C_{\text{dopamina}} = 1.0 \times 10^{-3}$ a 9.0×10^{-5} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.20$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

Para determinar la capacidad de predicción de los cuatro modelos de regresión mostrados en la Tabla 3, se prepararon dos disoluciones problema. La Tabla 4 muestra la predicción de la concentración de estas dos muestras. Comparando los resultados mostrados en la Tabla 3 y la Tabla 4, se puede comprobar como los mejores corresponden con los modelos de regresión contruidos con los datos electroquímicos (I_p , VC) y los espectroscópicos obtenidos a partir de los valores de absorbancia a 305

nm a +0.70 V ($A_{305\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_1) relacionados con la absorción de productos de oxidación que han sufrido el proceso de ciclación interna, como es el DAC. Esas dos regresiones tienen los mayores coeficientes de determinación (Tabla 3), asociado a unos mejores parámetros relacionados con la estimación de la concentración de dopamina en las muestras problema (Tabla 4). Además son los modelos que tienen un menor límite de detección como se puede ver en la Tabla 3. Por otro lado, son los modelos que tienen una mayor precisión en la estimación de la concentración de los problemas analizados, como se puede ver en la menor amplitud de los intervalos de confianza, tienen una mejor exactitud en las estimaciones, como queda reflejado en los menores errores relativos, y, además presentan los menores valores de desviación estándar relativa (%RSD), Tabla 4.

Tabla 3. Parámetros característicos obtenidos de los modelos de regresión por mínimos cuadrados construidos para los datos electroquímicos y espectroscópicos de las experiencias electroquímicas realizadas en el rango de concentraciones de dopamina entre 1.0×10^{-3} a 9.0×10^{-5} M mostradas en la Figura 46.^a

MÉTODO ^b	SENSIBILIDAD ^c (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^c (a)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL (S_{yx})	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
VC	$0.037 \text{ A} \times \text{M}^{-1}$	$-3.7 \times 10^{-6} \text{ A}$	3.53×10^{-7}	0.9991	4.8×10^{-5}
A_1	50.87 M^{-1}	$7.5 \times 10^{-3} \text{ a.u.}$	8.55×10^{-4}	0.9984	8.6×10^{-5}
A_2	16.59 M^{-1}	$2.1 \times 10^{-4} \text{ a.u.}$	8.57×10^{-4}	0.9824	24.0×10^{-5}
A_3	19.42 M^{-1}	$8.9 \times 10^{-4} \text{ a.u.}$	3.68×10^{-4}	0.9962	9.6×10^{-5}

^a La concentración de dopamina en tampón PBS (pH = 7) se varió entre 1.0×10^{-3} a 9.0×10^{-5} M.

^b Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (I_p , VC), y de la absorbancia a 305 nm ($A_{305\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_1), a 395 nm ($A_{395\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_2) y a 470 nm ($A_{470\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_3) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^c $y = a + b \times C_{\text{dopamina}}$

3. Resultados y discusión

La similitud entre las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico (I_p , VC) y con el mejor de los espectroscópicos ($A_{305\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_1) indica que los dos métodos se pueden utilizar de forma indistinta para determinar dopamina.

Tabla 4. Concentración estimada a partir de los modelos de regresión mostrados en la Tabla 3.

MÉTODO ^a	$C_{P1} = 5.5 \times 10^{-4}\text{ M}$			$C_{P2} = 2.5 \times 10^{-4}\text{ M}$		
	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c
VC	$[5.4 \pm 0.3] \times 10^{-4}$	2.0	-1.8	$[2.5 \pm 0.4] \times 10^{-4}$	4.1	0.0
A_1	$[5.7 \pm 0.5] \times 10^{-4}$	3.2	3.6	$[2.6 \pm 0.5] \times 10^{-4}$	7.0	4.0
A_2	$[5.7 \pm 1.4] \times 10^{-4}$	9.9	3.6	$[2.9 \pm 1.4] \times 10^{-4}$	19.5	16.0
A_3	$[5.5 \pm 0.6] \times 10^{-4}$	3.9	0.0	$[2.4 \pm 0.6] \times 10^{-4}$	8.6	-4.0

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (I_p , VC), y de la absorbancia a 305 nm ($A_{305\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_1), a 395 nm ($A_{395\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_2) y a 470 nm ($A_{470\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_3) cuando el potencial aplicado es +0.70 V. C_{P1} y C_{P2} son las concentraciones de las dos muestras problema de dopamina;

^b %RSD: desviación estándar relativa.

^c %Error relativo calculado como $(C_{Px} - C_{estimada}) \times 100 / C_{Px}$, donde C_{Px} es la concentración teórica de dopamina (C_{P1} o C_{P2}), y $C_{estimada}$ es la concentración de dopamina estimada con cada método.

Resultados similares se han obtenido con los otros dos modelos de regresión con datos espectroscópicos ($A_{395\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_2 y $A_{470\text{ nm}}^{+0.70\text{ V}}$, A_3), aunque sobre todo el obtenido a partir de los valores de absorbancia a 395 nm la precisión, exactitud y valores de %RSD son claramente peores, así como el coeficiente de determinación de la curva de calibrado. Este empeoramiento del modelo, probablemente se deba a que esta banda aparece solapada con la principal situada a 470 nm, lo que hace más difícil la cuantificación de dopamina a partir de la cantidad de DAQ generada en la reacción de oxidación. Cabe destacar que el rango de cuantificación en todos los modelos es muy

similar, entre 9.0×10^{-5} hasta 1.0×10^{-3} M para los modelos espectroscópicos a 305 y 395 nm, y entre 9.0×10^{-5} hasta 8.5×10^{-4} M para el modelo electroquímico y el espectroscópico a 470 nm.

La IUPAC recomienda que la veracidad de los resultados analíticos obtenidos con un método deben de ser validados con un segundo método independiente [238]. Los experimentos electroelectroquímicos, por su propia naturaleza, proporcionan dos respuestas analíticas distintas e independientes entre sí, como ya se ha comentado previamente. Así, una vez demostrado que ambas señales se pueden utilizar para determinar dopamina en medio PBS (pH = 7), se procedió a verificar la ausencia de sesgo comparando las estimaciones realizadas con ambos métodos. Para ello se compararon dos a dos, las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico (I_p , VC) y cada uno de los tres métodos espectroscópicos presentados en la Tabla 3.

Tabla 5. Parámetros característicos obtenidos de la comparación de las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico y uno de los tres modelos espectroscópicos mostrados en la Tabla 3.

MÉTODOS COMPARADOS ^a	INTERVALO DE LA PENDIENTE	INTERVALO DE LA ORDENADA EN EL ORIGEN /M	SENSIBILIDAD ^b (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R ²)
VC – A ₁	1.00 ± 0.08	$(0.0 \pm 3.7) \times 10^{-5}$	1.0000	$-4.8 \times 10^{-8} \text{ M}^{-1}$	0.9981
VC – A ₂	1.00 ± 0.23	$(0.1 \pm 9.8) \times 10^{-5}$	0.9974	$9.1 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$	0.9716
VC – A ₃	1.00 ± 0.12	$(0.1 \pm 4.9) \times 10^{-5}$	0.9981	$6.6 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$	0.9934

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (I_p , VC), y de la absorbancia a 305 nm ($A_{305 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₁), a 395 nm ($A_{395 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₂) y a 470 nm ($A_{470 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₃) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^b $VC_{\text{predicción}} = a + b \times (A_{xxx \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}})_{\text{predicción}}$

La Tabla 5 muestra los resultados obtenidos en las tres comparaciones posibles, apreciándose que en todos los casos se obtienen rectas en las que la pendiente tiene un valor de 1 y la ordenada de 0, concluyéndose que el método electroquímico y los

3. Resultados y discusión

espectroscópicos miden igual. De entre todas estas comparaciones cabe destacar la primera en la que se utilizan las estimaciones del método electroquímico y las del espectroscópico a 305 nm y +0.70 V, ya que es la que mejor coeficiente de determinación tiene. Con todos estos resultados se puede concluir que la espectroelectroquímica de absorción UV/Vis es una técnica autovalidada, lo que aumenta aún más su utilidad en análisis cuantitativo.

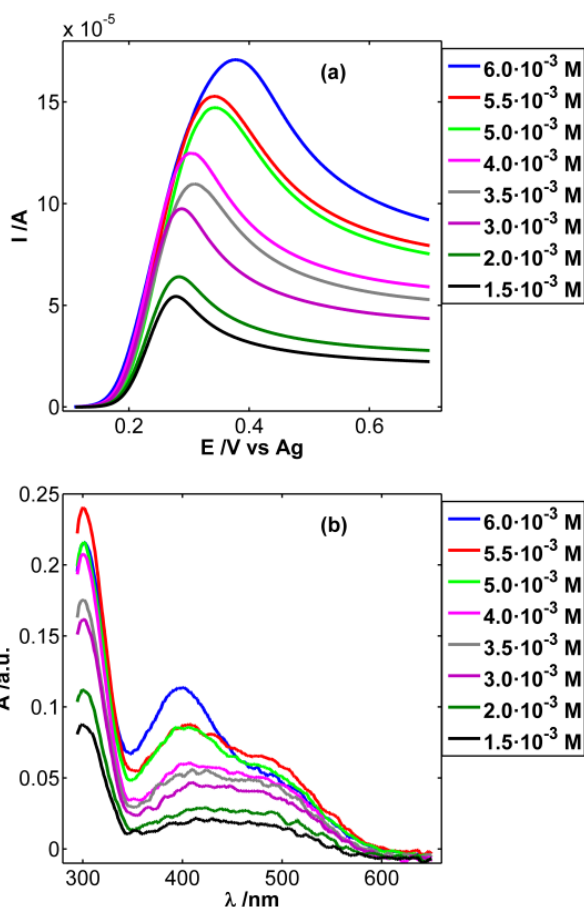


Figura 47. (a) Voltamperogramas lineales y (b) espectros de absorción cuando el potencial aplicado es de +0.70 V. $C_{\text{dopamina}} = 1.5 \times 10^{-3}$ a 6.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = +0.10$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

Tal y como se ha explicado anteriormente (Figura 40 y Figura 41), el proceso de oxidación de la dopamina en medio PBS (pH = 7) depende de la concentración. Por esta razón, y para analizar como afectaba este hecho a la cuantificación de dopamina se preparó un segundo conjunto de calibración con patrones de calibrado de dopamina

comprendidos entre 1.5×10^{-3} hasta 6.0×10^{-3} M. Se realizaron las correspondientes experiencias electroquímicas de absorción UV/Vis provocando la oxidación de la dopamina entre +0.10 V y +0.70 V a una velocidad de barrido de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. En la Figura 47.a se presentan los voltamperogramas lineales registrados donde se aprecia un claro desplazamiento del potencial de pico hacia mayores sobrepotenciales cuanto mayor es la concentración inicial de dopamina.

Por otro lado, en los espectros finales se puede comprobar cómo según va aumentando la concentración de dopamina, la banda situada en 395 nm emerge con mayor claridad, mientras que la banda de 470 nm aumenta mucho menos. Esta evidencia experimental está de acuerdo con las conclusiones extraídas del estudio del mecanismo de oxidación de la dopamina. A concentraciones mayores se forma mayor cantidad de DAQ, mientras que según disminuye la concentración de dopamina se genera mayor cantidad de DAC y otros productos secundarios de oxidación de esta dopamina.

Con fines comparativos, las respuestas escogidas para construir los modelos de calibración para este segundo conjunto de muestras fueron las mismas, tanto en la respuesta electroquímica como en la espectroscópica. Así tras realizar una regresión robusta por LMSR para detectar puntos anómalos, se construyeron los cuatro modelos de calibración por OLSR.

La Tabla 6 resume los parámetros de calibración obtenidos. Como se puede ver la sensibilidad de los modelos es claramente menor que la obtenida con el conjunto de calibración de concentraciones menores de dopamina, excepto para el modelo construido con la absorbancia a 395 nm ($A_{395 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A_2). Otro aspecto destacable es la peor calidad de las curvas de regresión obtenidas, como se puede comprobar al comparar los coeficientes de determinación, que en este caso son menores de 0.9967 cuando con el anterior conjunto de calibración el mejor valor era de 0.9991. En este caso, los mejores resultados se obtuvieron con el modelo electroquímico (I_p , VC) y el espectroscópico eligiendo la longitud de onda de 395 nm ($A_{395 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A_2), como se puede comprobar de los coeficientes de determinación.

3. Resultados y discusión

Tabla 6. Parámetros característicos obtenidos de los modelos de regresión por mínimos cuadrados construidos para los datos electroquímicos y espectroscópicos de las experiencias espectroelectroquímicas realizadas en el rango de concentraciones de dopamina entre 6.0×10^{-3} a 1.5×10^{-3} M mostradas en la Figura 47.^a

MÉTODO ^b	SENSIBILIDAD ^c (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^c (a)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL (S_{yx})	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
VC	$0.026 \text{ A} \times \text{M}^{-1}$	$1.7 \times 10^{-5} \text{ A}$	4.04×10^{-6}	0.9920	8.1×10^{-4}
A ₁	36.59 M^{-1}	$4.0 \times 10^{-2} \text{ a.u.}$	1.15×10^{-2}	0.9633	17.0×10^{-4}
A ₂	17.05 M^{-1}	$-9.3 \times 10^{-3} \text{ a.u.}$	1.58×10^{-3}	0.9967	5.6×10^{-4}
A ₃	12.51 M^{-1}	$2.9 \times 10^{-3} \text{ a.u.}$	2.33×10^{-3}	0.9876	12.0×10^{-4}

^a La concentración de dopamina en tampón PBS (pH = 7) se varió entre 1.5×10^{-3} a 6.0×10^{-3} M.

^b Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (I_p , VC), y de la absorbancia a 305 nm ($A_{305 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₁), a 395 nm ($A_{395 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₂) y a 470 nm ($A_{470 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₃) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^c $y = a + b \times C_{\text{dopamina}}$

Esta misma situación se repite al determinar la capacidad de predicción de estos modelos, datos mostrados en la Tabla 7. La mayor precisión y mejor exactitud se consiguieron con estos dos modelos, además de tener los menores valores de desviación estándar relativa (%RSD). Es destacable, que aunque los modelos de regresión no eran de tanta calidad como los construidos para el conjunto de calibración de concentraciones menores de dopamina, los valores de errores relativos y de desviación estándar relativa son similares, menores del 8% los primeros y del 7% los segundos para los dos mejores modelos de regresión.

Tabla 7. Concentración estimada a partir de los modelos de regresión mostrados en la Tabla 6.

Método ^a	$C_{P1} = 4.5 \times 10^{-3} \text{ M}$			$C_{P2} = 2.5 \times 10^{-3} \text{ M}$		
	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c
VC	$[4.7 \pm 0.4] \times 10^{-3}$	3.6	4.4	$[2.6 \pm 0.4] \times 10^{-3}$	6.7	4.0
A ₁	$[4.5 \pm 0.9] \times 10^{-3}$	7.7	0.0	$[3.1 \pm 0.9] \times 10^{-3}$	11.5	24.0
A ₂	$[4.6 \pm 0.3] \times 10^{-3}$	2.3	-2.2	$[2.3 \pm 0.3] \times 10^{-3}$	4.4	-8.0
A ₃	$[4.3 \pm 0.6] \times 10^{-3}$	5.2	-4.4	$[3.0 \pm 0.6] \times 10^{-3}$	7.4	20.0

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (I_p , VC), y de la absorbancia a 305 nm ($A_{305 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₁), a 395 nm ($A_{395 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₂) y a 470 nm ($A_{470 \text{ nm}}^{+0.70 \text{ V}}$, A₃) cuando el potencial aplicado es +0.70 V. C_{P1} y C_{P2} son las concentraciones de las dos muestras problema de dopamina;

^b %RSD: desviación estándar relativa.

^c %Error relativo calculado como $(C_{Px} - C_{\text{estimada}}) \times 100 / C_{Px}$, donde C_{Px} es la concentración teórica de dopamina (C_{P1} o C_{P2}), y C_{estimada} es la concentración de dopamina estimada con cada método.

Finalmente se llevó a cabo la comparación de las estimaciones realizadas con cada uno de los modelos espectroscópicos con el modelo electroquímico, para determinar si había ausencia de sesgo. Tabla 8 muestra los resultados obtenidos en las tres comparaciones posibles, apreciándose que en todos los casos se obtienen rectas en las que la pendiente tiene un valor de 1 y la ordenada de 0, concluyéndose que ambos tipos de métodos miden igual y que la espectroelectroquímica de absorción UV/Vis es una técnica autovalidada, tal y como se había indicado anteriormente.

Tal y como ha quedado demostrado, la técnica quimiométrica de regresión univariante por mínimos cuadrados ordinarios no es útil para estudiar el rango de concentraciones comprendido entre 9.0×10^{-5} hasta $6.0 \times 10^{-3} \text{ M}$, ya que las pendientes de los modelos construidos son diferentes. Este problema puede evitarse utilizando

3. Resultados y discusión

herramientas quimiométricas más potentes como son las regresiones multivariantes, eligiéndose en este caso la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR). Con este fin se decidió trabajar con los datos espectrales tomando más de una longitud de onda para construir los modelos, eligiendo en este caso todo el rango más informativo comprendido entre 290 y 550 nm, escogiendo todo el rango de concentraciones de dopamina comprendido entre 9.0×10^{-5} hasta 6.0×10^{-3} M. Finalmente, se eligieron, como en los modelos de regresión univariante construidos anteriormente, los espectros de absorción al potencial vértice, +0.70 V.

Tabla 8. Parámetros característicos obtenidos de la comparación de las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico y uno de los tres modelos espectroscópicos mostrados en la Tabla 6.

MÉTODOS COMPARADOS ^a	INTERVALO DE LA PENDIENTE	INTERVALO DE LA ORDENADA EN EL ORIGEN /M	SENSIBILIDAD ^b (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R ²)
VC – A ₁	1.00 ± 0.18	(0.1 ± 6.5) × 10 ⁻⁴	1.0021	-6.7 × 10 ⁻⁶ M ⁻¹	0.9779
VC – A ₂	0.99 ± 0.18	(0.5 ± 6.3) × 10 ⁻⁴	0.9865	4.4 × 10 ⁻⁵ M ⁻¹	0.9835
VC – A ₃	1.00 ± 0.17	(0.1 ± 9.6) × 10 ⁻⁴	1.0010	-4.8 × 10 ⁻⁶ M ⁻¹	0.9848

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de dopamina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (*I_p*, VC), y de la absorbancia a 305 nm (*A*_{305 nm}^{+0.70 V}, A₁), a 395 nm (*A*_{395 nm}^{+0.70 V}, A₂) y a 470 nm (*A*_{470 nm}^{+0.70 V}, A₃) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^b VC_{predicción} = a + b × (*A*_{xxx nm}^{+0.70 V})_{predicción}

De este modo las variables independientes o predictoras fueron los valores de absorbancia entre 290 y 550 nm a +0.70 V (330 longitudes de onda), mientras que las variables dependientes fueron las 15 muestras patrón preparadas con concentraciones de dopamina entre 9.0×10^{-5} hasta 6.0×10^{-3} M. Como el número de variables independientes es mucho mayor que el de variables dependientes existen problemas de multicolinealidad que se resuelven con PLSR. Al construir este modelo se seleccionaron únicamente dos variables latentes relacionadas con los dos productos de oxidación mayoritarios generados durante la oxidación de dopamina en medio PBS (pH

= 7), DAQ y DAC, variables latentes seleccionadas tras realizar un Análisis por Componentes Principales (PCA) de los datos.

En la Figura 48.a se presentan los loadings de estas dos variables latentes, pudiéndose identificar la primera con el espectro de los productos secundarios de oxidación entre ellos el DAC con un máximo en 305 y otro en 470 nm, mientras que la segunda variable latente se relaciona con el espectro de la DAQ con un máximo en 395 nm.

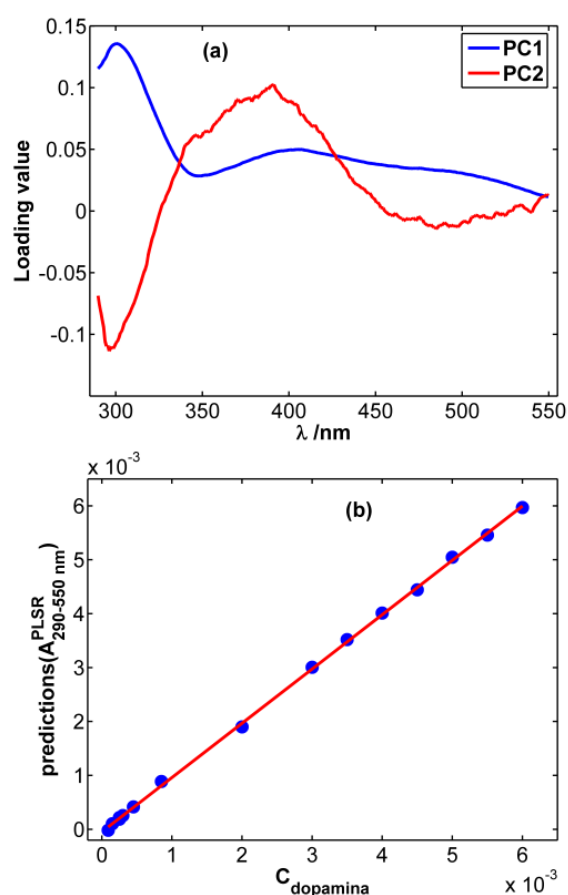


Figura 48. (a) Imagen de los loadings tras realizar Análisis por Componentes Principales (PCA) de los espectros entre 290 y 550 nm para el conjunto de patrones de dopamina con concentración comprendida entre 9.0×10^{-5} hasta 6.0×10^{-3} M a +0.70 V. (b) Curva de regresión obtenida con las predicciones realizadas con el modelo espectroscópico tras realizar regresión multivariante con PLSR. $C_{\text{dopamina}} = 9.0 \times 10^{-5}$ a 6.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = +0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

3. Resultados y discusión

El modelo de regresión construido (Figura 48.b) presenta unos parámetros que indican la buena aproximación realizada cuando se quiere realizar un calibrado ampliando el rango de concentraciones de dopamina: $y = -4.5 \times 10^{-5} + 1.007 \times C_{\text{dopamina}}$ ($R^2 = 0.9996$, $S_{yx} = 4.44 \times 10^{-5}$).

Por último se llevó a cabo la estimación de la concentración de dos muestras problema cuya concentración real era 2.5×10^{-3} y 5.5×10^{-4} M. Los intervalos de confianza obtenidos para estas dos estimaciones fueron $[2.6 \pm 0.1] \times 10^{-3}$ (%RSD = 1.8%), $[6.4 \pm 0.8] \times 10^{-4}$ (%RSD = 5.6%). A la vista de estos resultados se puede concluir que los datos espectrales analizados con regresiones univariantes se encuentran influenciados por la concentración de dopamina, conduciendo a predicciones erróneas a causa de la contribución de los compuestos generados durante la oxidación de dopamina. Sin embargo, con el modelo multivariante construido estos problemas no afectan a la predicción final ampliando las posibilidades que ya ofrece la espectroelectroquímica de absorción en el UV/Vis.

Finalmente se realizó la comparación entre las estimaciones de la regresión electroquímica (VC) y la regresión espectral tras construir el modelo multivariante con PLSR (Figura 49) indicando la ausencia de sesgo, como ya se había obtenido con los modelos univariantes: $a = [1.00 \pm 0.01]$ y $b = [0.08 \pm 3.14] \times 10^{-5}$, quedando patente una vez más la autovalidación de la espectroelectroquímica como técnica analítica.

A modo de resumen de este capítulo, podemos concluir que la espectroelectroquímica de absorción molecular en el UV/Vis no solo presenta un gran potencial a la hora de elucidar mecanismo de reacción, sino que además presenta un alto potencial con fines analíticos. La posibilidad de “ver” los productos de las reacciones electródicas permite mejorar las cuantificaciones cuando estos productos varían de forma lineal con la concentración del analito precursor.

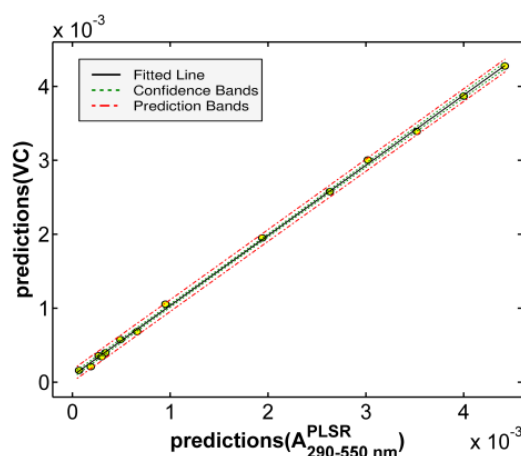


Figura 49. Curva de regresión de las predicciones realizadas con el modelo electroquímico y las realizadas con el modelo espectroscópico tras realizar regresión multivariante con PLSR.. $C_{\text{dopamina}} = 9.0 \times 10^{-5}$ a 6.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = +0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.135$ s.

3.2 ESTUDIO ESPECTROELECTROQUÍMICO DE ADRENALINA

3.2.1 ESPECTROELECTROQUÍMICA DE LA ELECTRO-OXIDACIÓN DE ADRENALINA

Para realizar el estudio de oxidación de adrenalina se realizaron una serie de experimentos espectroelectroquímicos de absorción en el UV/Vis con el objetivo inicial de explicar el mecanismo de oxidación de adrenalina con esta técnica multirespuesta. La Figura 50.a presenta la señal voltamperométrica obtenida durante la oxidación de adrenalina 10^{-3} M en medio neutro (PBS, pH = 7) durante un barrido cíclico de potencial entre -0.50 V y +0.70 V a $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, mientras se registra de forma simultánea la evolución de los espectros de absorción entre 210 y 680 nm (Figura 50.b). El voltamperograma cíclico muestra un pico de oxidación a +0.29 V relacionado con la oxidación de la adrenalina, y un pico de reducción a -0.24 V. Analizando la evolución de los espectros de absorción se puede apreciar como durante todo el barrido voltamperométrico crecen dos bandas de absorción a 302 y 485 nm.

El mecanismo de oxidación de la adrenalina en medio neutro implica, tal y como se ha comentado en la sección 3.2, la formación de adenoquinona (ADQ) que por un

3. Resultados y discusión

proceso de ciclación interna genera adenocromo (ADC), siendo estos inicialmente los principales productos de oxidación. Tal y como se encuentra descrito en bibliografía [239], la ADQ es el primer producto de oxidación de la adrenalina que presenta una banda de absorción a 380 nm debido a la transición $n \rightarrow \pi^*$ del grupo carbonilo. La ADQ [159] es un compuesto que en medios no fuertemente ácidos sufre rápidamente un proceso de ciclación interna dando lugar a la aparición de un producto de oxidación más estable, el ADC vía leucoadenocromo. Por lo tanto, en las condiciones experimentales elegidas en este experimento, $\text{pH} = 7$ y $C_{\text{adrenalina}} = 10^{-3} \text{ M}$, la ADQ es un producto de oxidación prácticamente imperceptible ya que la reacción de ciclación interna es muy rápida, Figura 50.

Las dos bandas que aparecen en el espectro a 302 y 485 nm (Figura 50) están relacionadas, por tanto, con el producto de oxidación generado tras la reacción de ciclación interna, el ADC, [239,240]. El crecimiento prácticamente constante de estas dos bandas absorciométricas a lo largo de todo el barrido de potencial indica que el principal producto de reacción se está generando de forma continuada, no produciéndose, aparentemente su reducción en el barrido catódico. Esto indica que el pico de reducción a -0.24 V no se corresponde con la reducción de la ADC de la adrenalina, si no a otro compuesto generado en el medio tras la oxidación electroquímica de la adrenalina.

Con el objetivo de intentar identificar de una forma más clara los diferentes compuestos formados durante la oxidación electroquímica de adrenalina, se realizaron experiencias espectroelectroquímicas a diferentes velocidades de barrido. Este factor condiciona de forma muy significativa la evolución de los productos de oxidación generados en la oxidación de este neurotransmisor, permitiendo analizar este complejo mecanismo de reacción. En la Figura 51 se presenta el voltamperograma cíclico y la evolución de los espectros de absorción para una experiencia realizada en las mismas condiciones que las mostradas en la Figura 50, pero aumentando la velocidad de barrido, trabajando en este caso a $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

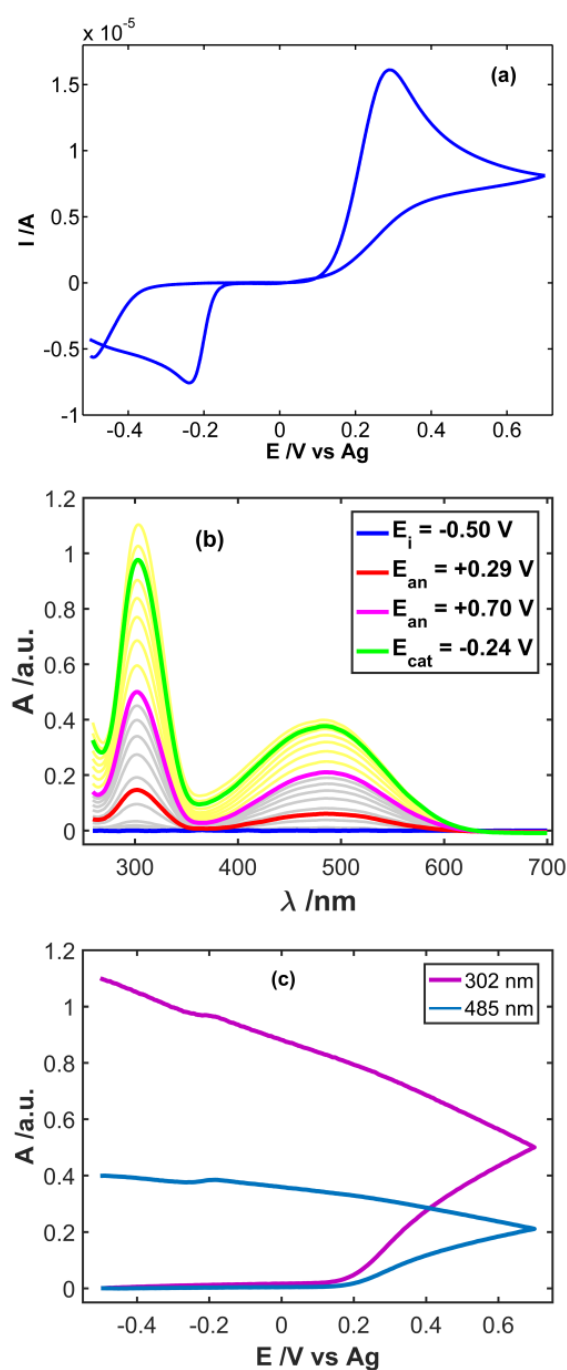


Figura 50. (a) Voltamperograma cíclico de oxidación de adrenalina, (b) evolución de los espectros de absorción en el UV/Vis durante el barrido cíclico de potencial, y (c) voltabsorciogramas a 302 y 485 nm. $C_{adrenalina} = 1.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = -0.50$ V, $E_{final} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = 0.005 V \times s $^{-1}$. (Imagen (b): Líneas grises \Rightarrow barrido de oxidación; líneas amarillas \Rightarrow barrido de reducción).

3. Resultados y discusión

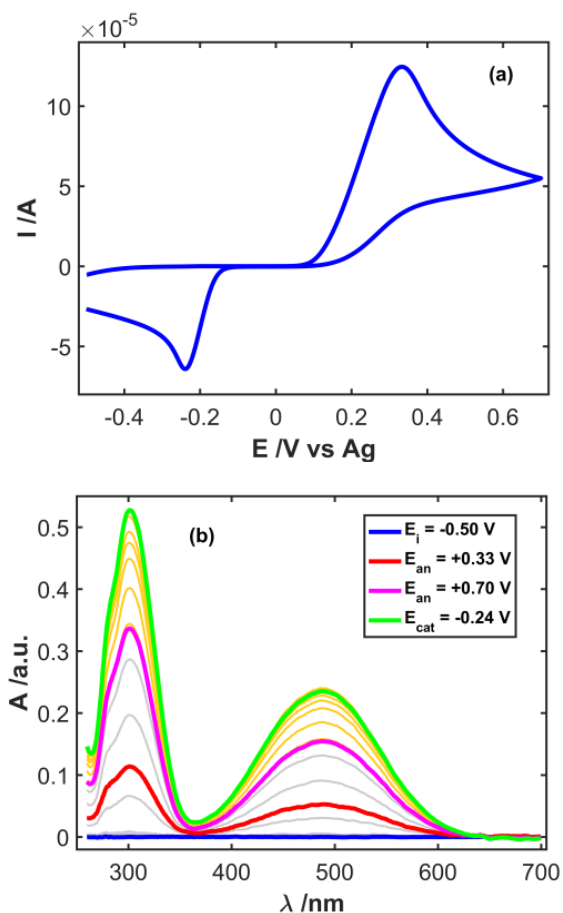


Figura 51. (a) Voltamperograma cíclico de oxidación de adrenalina, y (b) evolución de los espectros de absorción en el UV/Vis durante el barrido cíclico de potencial. $C_{\text{adrenalina}} = 1.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.50$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. (Imagen (b): Líneas grises \Rightarrow barrido de oxidación; líneas amarillas \Rightarrow barrido de reducción).

El voltamperograma mostrado la Figura 51.a muestra un único pico de oxidación a +0.33V, ligeramente desplazado a potenciales más anódicos que el registrado a $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, debido a que inicialmente es un proceso que ocurre bajo régimen de difusión semi-infinita y está controlado por la difusión del producto de reacción, adrenalina, hasta la superficie del electrodo. Los espectros registrados durante este proceso (Figura 51.b) muestran dos bandas principales centradas en 305 y 485 nm, como ya se describió en la Figura 50, y una banda solapada con la de 305 nm, que emerge a longitudes de onda menores, entre 270 y 280 nm. Esta banda de absorción se puede asignar a la generación de otros subproductos de oxidación generados por

indolización de la adrenalina [156,165] que entre otras bandas de absorción presenta dos en la región UV del espectro, a 270 y 295 nm [241] y otras en torno a 500-550 nm [242]. Esto indicaría que la banda a 485 nm, podría presentar solapada otra a 500-550 nm, relacionada con estos procesos de indolización. Representando los voltabsorciogramas derivados para las dos velocidades de barridos analizadas, seleccionando las dos longitudes de onda más intensas (302 y 485nm) se puede apreciar como las señales derivadas reproducen las señales voltamperométricas (Figura 50.a, Figura 51.a y Figura 52).

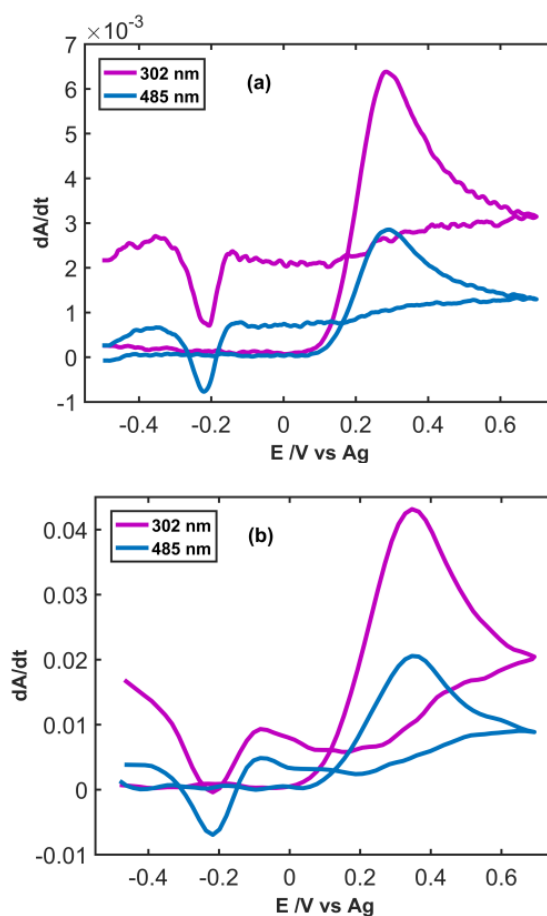


Figura 52. Voltabsorciogramas derivados a 302 y 485 nm registrados durante la oxidación de adrenalina. (a) $v = 0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ y (b) $v = 0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. $C_{\text{adrenalina}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$. Disoluciones preparadas en tampón PBS ($\text{pH} = 7$). $E_{\text{inicial}} = -0.50 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = +0.70 \text{ V}$.

El pico de oxidación se sitúa en +0.28 (Figura 52.a) y +0.34 V (Figura 52.b), estando desplazado a potenciales más positivos al aumentar la velocidad de barrido.

3. Resultados y discusión

En cambio, el pico de reducción aparece situado a -0.22 V en ambas experiencias, no afectando la velocidad de barrido a su posición, al igual que ocurría en la señal voltamperométrica. Esto indicaría que ese pico catódico está relacionado con especies depositadas sobre el electrodo, no estando por tanto regido por difusión el proceso de reducción. Al aparecer estos dos picos de reducción a las dos longitudes de onda y en las dos velocidades de barrido estudiadas, aparentemente el proceso de reducción apreciado en torno a -0.24 V estaría relacionado con la reducción del ADC generado en el barrido de oxidación.

Esta conclusión entra en contradicción con las extraídas anteriormente de la evolución de la absorbancia a estas mismas longitudes de onda (Figura 50.c), ya que ésta aumenta continuamente durante todo el barrido voltamperométrico. Si fuera el ADC el que es consumido en este pico a -0.22 V, la absorbancia dejaría de aumentar, y solo se aprecia una ligera disminución, solapada con el ascenso general.

La comparación del voltamperograma con el voltabsorciograma derivado a 280 nm (Figura 53.a y Figura 53.b), banda que coincide aproximadamente con el hombro observado en los espectros de la Figura 51.b, durante 4 ciclos consecutivos de potencial puede ayudar a comprender este proceso. Se puede ver como únicamente en el primer barrido de oxidación se puede ver el pico de oxidación en 280 nm, atribuido a la oxidación de la adrenalina (línea negra en Figura 53.b). En los ciclos posteriores, ese pico desaparece, y lo que se aprecia claramente es el par de picos reversibles en torno a -0.20 V. Indicando que esta banda de 280 nm solapada con la de 302 nm, debe estar relacionada con otro compuesto diferente al ADC. Como se ha comentado anteriormente, existe otra banda en la región de 500 nm, relacionada con el mismo tipo de compuestos derivados del indol. Analizando el voltabsorciograma derivado a 485 nm (Figura 53.c), se aprecia mucho más definido el par de picos reversibles en torno a -0.20 V, siendo visible en los 4 ciclos de potencial el pico de oxidación. Lo mismo ocurre a 302 nm, como se puede ver en la Figura 53.d, donde de forma comparada se han representado los voltabsorciogramas derivados a las 3 longitudes de onda características correspondientes al cuarto barrido de potencial. Las bandas de 302 y 485 nm muestran comportamiento tanto del ADC como de los derivados indólicos, mientras que la de 280 nm únicamente de estos derivados indólicos.

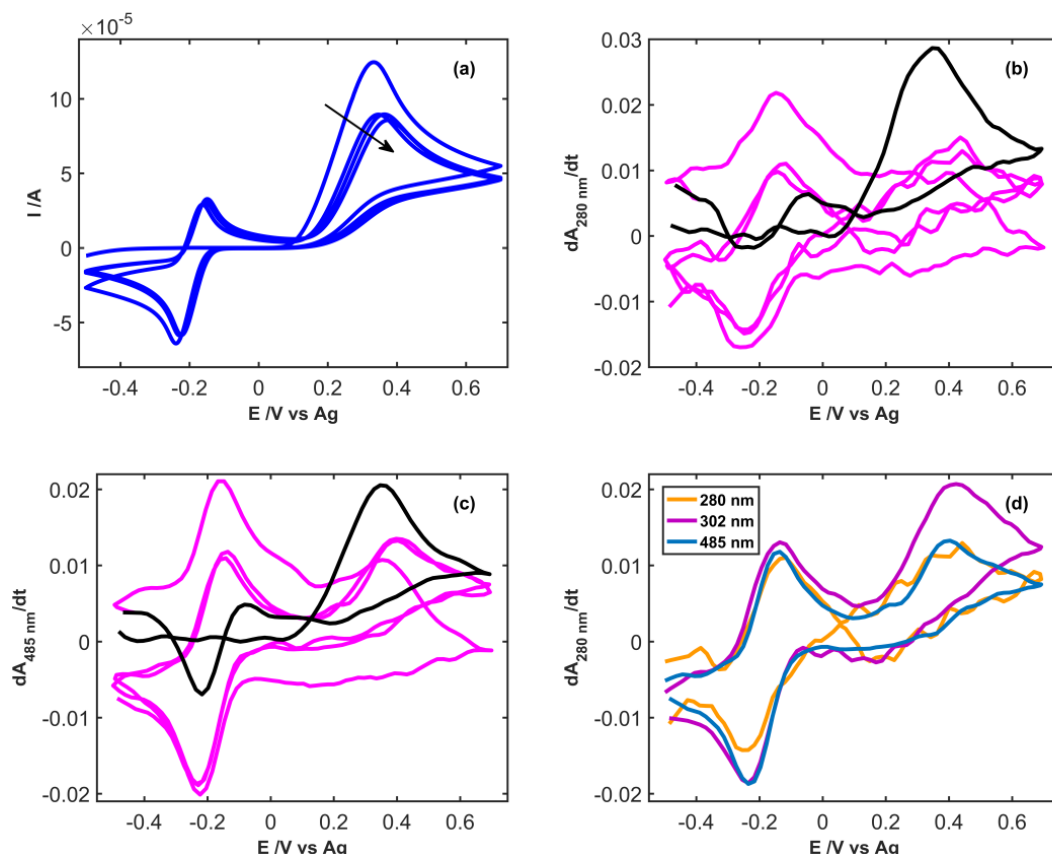


Figura 53. (a) Voltamperograma cíclico de oxidación de adrenalina, (b) voltabsorciograma derivado a 285 nm durante 4 ciclos de potencial, (c) voltabsorciograma derivado a 485 nm durante 4 ciclos de potencial, y (d) voltabsorciogramas derivados en el 4º barrido de potencial para 280, 302 y 485 nm. $C_{\text{adrenalina}} = 1.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.50$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Para tratar de separar la contribución de los diferentes compuestos generados durante la oxidación de la adrenalina se realizó un tratamiento multivariante de los datos usando la metodología descrita para la dopamina. Éste consiste en tratar de determinar las variables con más peso en las señales registradas combinando ICA [235–237] con el algoritmo MCR-ALS. El procedimiento consigue deconvolucionar la señal original en las diferentes componentes de las que consta. Este estudio se desarrolló para las tres velocidades de barrido diferentes: $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, $0.001 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, y $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. El resto de condiciones de trabajo fueran las mismas que en los experimentos anteriores: $C_{\text{adrenalina}} = 10^{-3}$ M en medio neutro (PBS, pH = 7), barrido

3. Resultados y discusión

cíclico de potencial entre -0.50 V y +0.70 V, y registro simultáneo de la evolución de los espectros de absorción entre 210 y 680 nm.

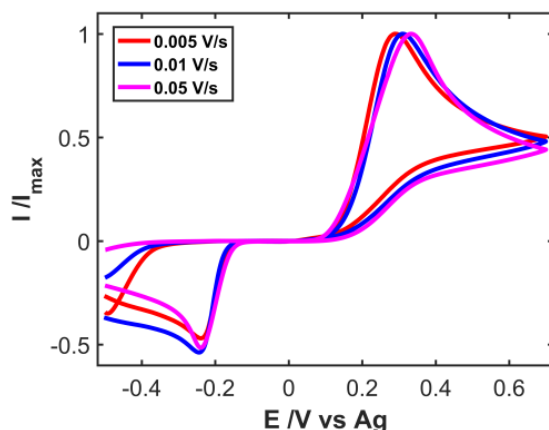


Figura 54. Representación de los voltamperogramas cíclicos normalizados registrados durante el 1^{er} ciclo de oxidación de adrenalina a tres velocidades de barrido diferentes. $C_{\text{adrenalina}} = 1.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.50$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V. $v = 0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (roja), $v = 0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (azul) y $v = 0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (rosa).

La Figura 54 representa el comportamiento electroquímico de la reacción de oxidación de adrenalina a las tres velocidades indicadas. Se observa como el comportamiento de los tres voltamperogramas es el mismo, apreciando únicamente un ligero desplazamiento del pico anódico a potenciales más positivos al aumentar la velocidad de barrido.

En el análisis con ICA, los criterios de partida fueron seleccionar únicamente dos componentes, ya que inicialmente los compuestos mayoritarios serían ADQ y ADC, y los datos espectroscópicos entre 230 y 640 nm correspondientes al primer barrido de potencial. Tras esta primera deconvolución de los datos se llevó a cabo el análisis con MCR-ALS, donde se impuso el criterio de no electronegatividad en los valores de concentración y absorbancia, ya que los espectros serán de las especies electrogeneradas durante la oxidación electroquímica de la adrenalina, cuyos espectros de absorción crecen según se generan en el medio de reacción.

La Figura 55 muestra los resultados tras el análisis multivariante con MCR-ALS de las experiencias a las tres velocidades indicadas anteriormente. Los espectros deconvolucionados para las dos componentes analizadas, C_1 y C_2 , muestran comportamientos muy similares para C_1 donde aparece tres bandas muy bien definidas y centradas en 240, 300 y 490 nm. Mientras que para C_2 , los espectros deconvolucionados presentan dos bandas a 245 y 303 nm, y una banda muy ancha con valores de absorbancia significativos en torno a 400 nm, indicando que en esa banda que se apreciaba en 485 en los espectros originales había contribución de más de una especie. Es significativo que el peso e importancia de la banda en torno a 400 nm es más clara cuando más baja es la velocidad de barrido, indicando que a menor velocidad más se genera de esa especie. Por otro lado, analizando la evolución de la señal relacionada con la concentración de las especies para esas dos componentes, se aprecia como la evolución para C_2 es creciente desde el momento en que comienza el proceso de oxidación de la adrenalina hasta finalizar el barrido completo, anódico hasta +0.70 V y catódico hasta -0.60 V. En cambio, la componente C_1 muestra un comportamiento muy diferente, crece bruscamente al principio para luego hacerlo a una velocidad menor. En el barrido catódico, incluso llega un momento en que llega a decrecer ligeramente.

Debido a la complejidad de este sistema, no ha sido posible obtener una deconvolucion total de las señales, aunque si nos da cierta información muy importante sobre los procesos y compuestos que se generan durante la oxidación de adrenalina. La componente 1 (C_1) tiene información relacionada con la formación no solo del adenocromo evidenciado por la banda en 485 nm, ya deducido de las señales sin deconvolucionar, sino también de la adenoquinona cuya banda de absorción se sitúa en torno a 380-390 nm [158].

Por otro lado, la componente 2 (C_2) muestra un perfil de concentraciones creciente durante todo el barrido que se puede relacionar con la progresiva pasivación de la superficie electródica debida a la formación de adenocromo y los derivados indólicos. La formación de estos derivados parece claro por la aparición de la banda en torno a 240 nm, ya que absorben a longitudes de onda menores a 300 nm.

3. Resultados y discusión

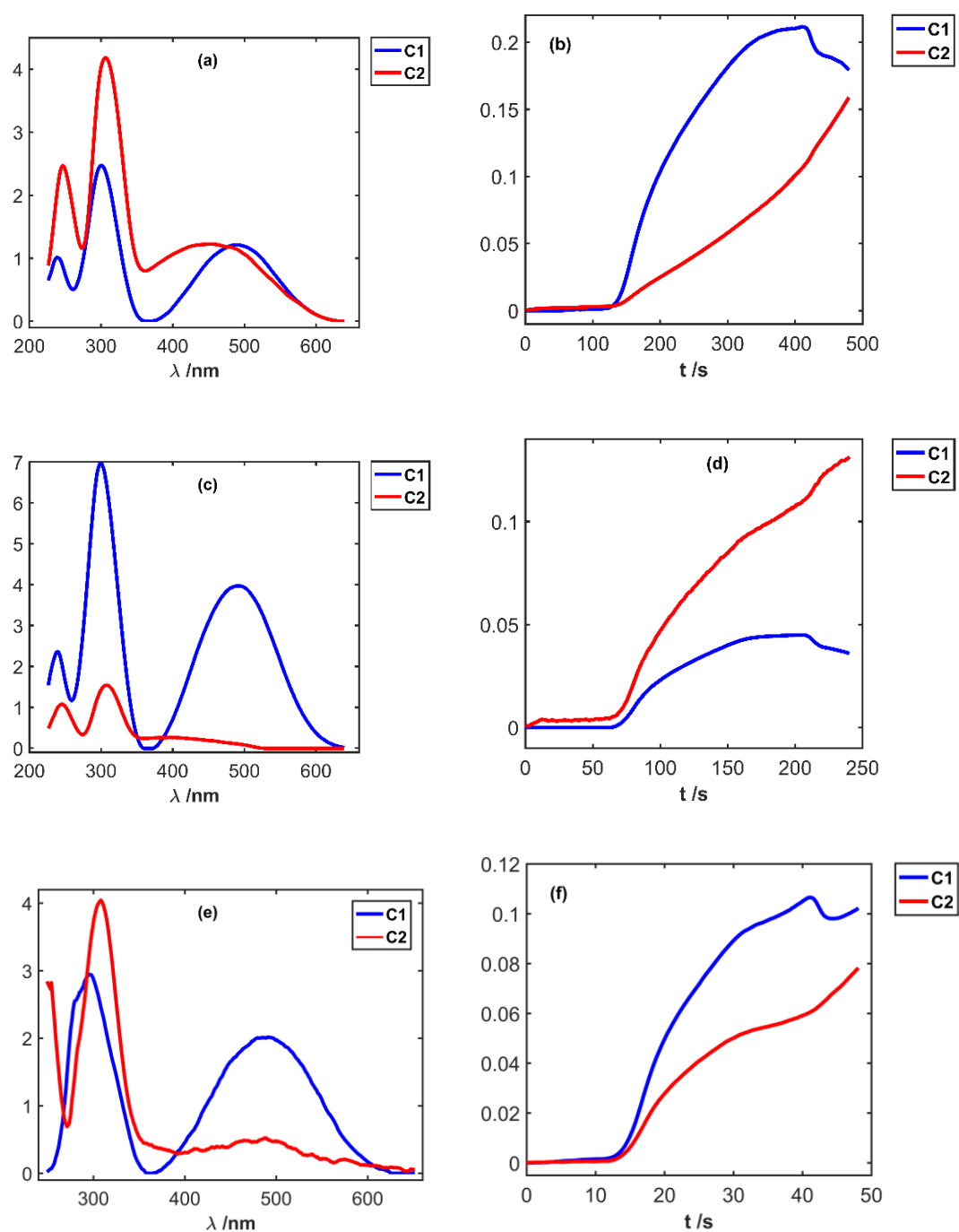


Figura 55. (a, c, e) MCR-ALS deconvolución espectral registrada durante la oxidación de adrenalina; (b, d, f) perfiles de concentración vs tiempo para las especies resueltas por MCR-ALS. $v = 0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (a, b), $v = 0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (c, d) y $v = 0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ (e, f). $C_{\text{adrenalina}} = 1.0 \times 10^{-3} \text{ M}$. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.50 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = +0.70 \text{ V}$.

Este análisis combinado con ICA y MCR-ALS ha permitido determinar que todos los compuestos descritos en bibliografía que se generan durante la oxidación de la adrenalina se generan en medio PBS, pH = 7, siendo la cadena de equilibrios químicos complejos y difíciles de discriminar claramente, como ya indicaban las señales originales, donde no era fácil determinar la presencia de todos estos compuestos. Por otro lado la velocidad de barrido parece ser determinante para visualizar determinados compuestos, como es el caso de la adenoquinona apreciada más claramente en la velocidad de barrido más baja, $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

3.2.2 DETERMINACIÓN ESPECTROELECTROQUÍMICA DE ADRENALINA

Los experimentos espectroelectroquímicos no sólo proporcionan información acerca del mecanismo de oxidación de la adrenalina sino que también nos dan información cuantitativa de la misma. Con el objetivo de determinar la utilidad de la espectroelectroquímica de absorción en el UV/Vis en la determinación cuantitativa de adrenalina en medio PBS (pH = 7), se preparó un conjunto de 16 muestras de calibrado variando la concentración de este neurotransmisor entre $3 \times 10^{-5} \text{ M}$ hasta $7 \times 10^{-3} \text{ M}$. Se llevó a cabo el registro simultáneo de las señales electroquímica y espectroscópica de cada una de estas disoluciones preparadas, midiéndolas de forma aleatoria y barriendo el potencial entre 0.00 V y +0.70 V a una velocidad de barrido de potencial de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Las señales registradas fueron el voltamperograma lineal en ese rango de potenciales y la evolución de los espectros de absorción entre 290 nm y 900 nm (Figura 56). Como se puede apreciar en la Figura 56, al aumentar la concentración de adrenalina, aumenta la intensidad de pico en el voltamperograma lineal desplazándose ligeramente a potenciales más positivos, y aumenta los valores de absorbancia de las dos bandas observadas en este rango de longitudes de onda a 302 nm y 485 nm.

Como ya se describió en el apartado 3.1.1 de determinación espectroelectroquímica de dopamina, es posible abordar la determinación espectroelectroquímica de un analito desde dos puntos de vista: con los datos electroquímicos registrados, y con los datos espectroscópicos.

3. Resultados y discusión

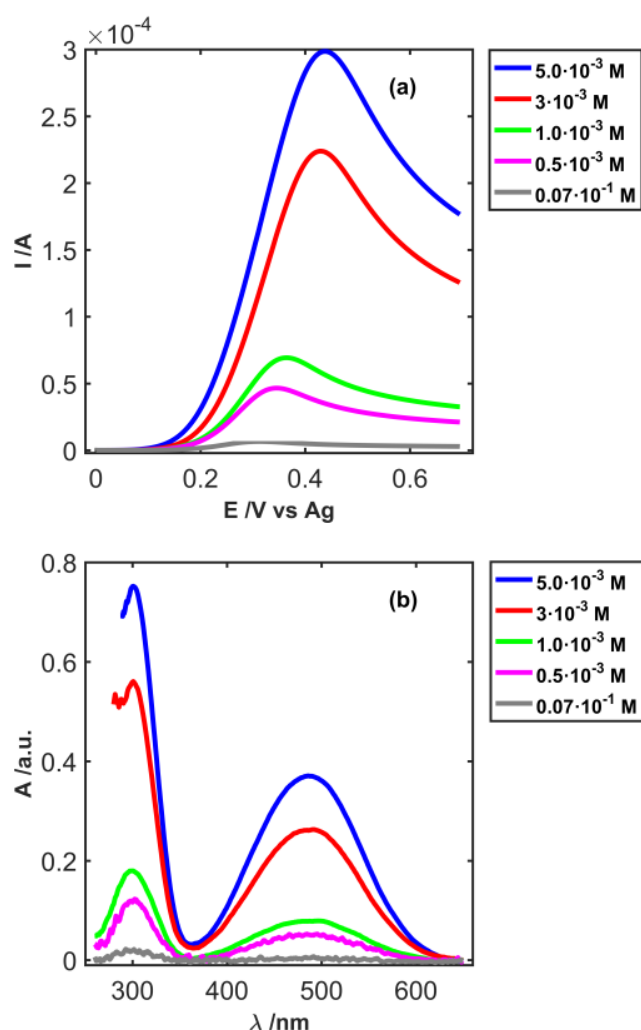


Figura 56. (a) Voltamperogramas lineales y (b) espectros de absorción cuando el potencial aplicado es de +0.70 V. Patrones de adrenalina con concentración comprendida entre 7.0×10^{-5} hasta 7.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V. $v = 0.05$ V \times s $^{-1}$, $t_{\text{integración}} = 0.10$ s.

La cuantificación de adrenalina, haciendo uso de los datos voltaperométricos, se puede realizar de la forma más sencilla utilizando únicamente las intensidades de pico de los diferentes voltamperogramas registrados. Así, realizando una regresión por mínimos cuadrados (OLSR) previa detección y eliminación de los datos anómalos con una regresión robusta por mínima mediana de cuadrados (LMSR) se obtuvieron los parámetros característicos mostrados en la primera línea de la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros característicos obtenidos de los modelos de regresión realizados con los datos electroquímicos de las experiencias espectroelectroquímicas realizadas en el rango de concentraciones de adrenalina entre 3×10^{-5} a 7×10^{-3} M mostrados en la Figura 56.

MÉTODO ^a	SENSIBILIDAD ^c (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL (S_{yx})	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
VC _{ip}	0.0461 A M ⁻¹	2.35×10^{-5} A	1.67×10^{-6}	0.9998	2.7×10^{-5}
VC _{PLS, 1CP}	0.9994 A M ⁻¹	9.75×10^{-7} A	1.67×10^{-6}	0.9994	1.0×10^{-4}
VC _{PLS, 2CP}	0.9999 A M ⁻¹	2.28×10^{-5} A	1.67×10^{-6}	0.9999	1.0×10^{-4}

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (VC_{ip}), y de la intensidad de corriente entre +0.20 y +0.70 V eligiendo 1 (VC_{PLS, 1CP}) o 2 variables latentes (VC_{PLS, 2CP}) para construir el modelo de calibración PLS.

^b $y = a + b \times C_{\text{adrenalina}}$.

Adicionalmente hay un segundo modo de abordar el tratamiento de estos datos electroquímicos, viendo, tal y como se ha descrito en el apartado 3.2.1, que hay más de una especie implicada en las señales registradas en estas experiencias espectroelectroquímicas. Este otro método se basa en no tomar únicamente un valor de intensidad de corriente, la intensidad de pico, si no todos los valores de corriente en el intervalo de potenciales donde hay cambios relacionados con la reacción que se está estudiando. En este caso ese rango es el comprendido entre +0.20 y +0.70 V, potenciales en los que se define el pico de oxidación mostrado en la Figura 56.a.

Para tratar todo este conjunto de datos se realiza un tratamiento multivariante de los datos, realizando una regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR). Previo a realizar esta regresión se lleva a cabo un análisis por componentes principales (PCA) de los datos, viendo que dos son las componentes principales más informativas sobre el proceso, probablemente relacionadas con los dos tipos de señales espectrales obtenidas en el análisis con ICA y MCR-ALS en el apartado 3.2.1. La Figura 57

3. Resultados y discusión

muestra los loadings las dos primeras variables latentes, pudiéndose diferenciar dos contribuciones diferentes al voltamperograma de la adrenalina, una de un compuesto cuyo pico de oxidación está centrado en +0.38 V y una segunda de un segundo compuesto cuyo pico de oxidación se sitúa en +0.48 V. Teniendo en cuenta el mecanismo de oxidación, se puede asignar la primera variable latente a la oxidación de adrenalina hasta adenoquinona, mientras que la segunda estará relacionada con la formación de adenocromo y otros productos secundarios de oxidación.

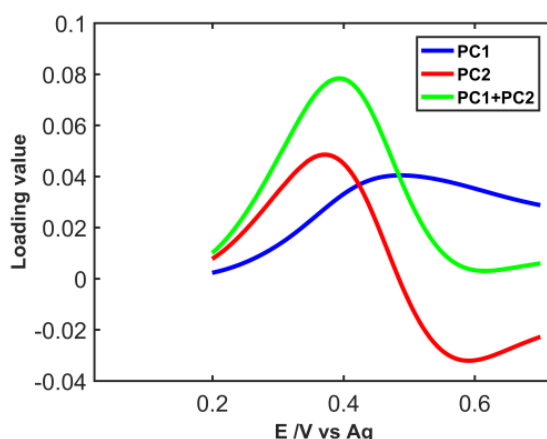


Figura 57. Valores de los loadings tras realizar Análisis por Componentes Principales (PCA) de los voltamperogramas entre +0.20 y +0.70 V para el conjunto de patrones de adrenalina con concentración comprendida entre 7.0×10^{-5} hasta 7.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V. $v = 0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Se realizó la regresión PLS teniendo únicamente la primera variable latente (segunda línea, Tabla 9) y las dos variables latentes (tercera línea, Tabla 9) y como se puede apreciar los parámetros de calibración mejoran ligeramente al aumentar en número de variables latentes. Pero lo más significativo es la mejora apreciada en la estimación de la concentración de dos muestras problema preparadas cuya concentración se situó en 9×10^{-4} M y 4×10^{-4} M, mostrada en la Tabla 10.

El análisis multivariante de los datos electroquímicos con las dos variables latentes mejora sensiblemente el error relativo cometido en la estimación de concentración de disolución más concentrada, y mantiene el de la más diluida. Al

comparar los resultados obtenidos con una o dos variables latentes, se observa una clara mejoría en términos de menor error relativo, menor %RSD, y menor amplitud del intervalo de confianza. Estos resultados indican que en este caso, es necesario tener en cuenta ambas variables latentes al contribuir los dos tipos de compuestos generados a la intensidad de corriente registrada en los voltamperogramas lineales (Figura 56.a).

Tabla 10. Concentración estimada a partir de los modelos de regresión mostrados en la Tabla 9.

MÉTODO ^a	$C_{P1} = 9 \times 10^{-4} \text{ M}$			$C_{P2} = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$		
	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c
VC _{ip}	$[9.9 \pm 1.0] \times 10^{-4}$	4.0	-10.0	$[3.7 \pm 1.0] \times 10^{-4}$	10.7	7.5
VC _{PLS, 1CP}	$[9.3 \pm 1.7] \times 10^{-4}$	7.0	-3.3	$[4.8 \pm 1.7] \times 10^{-4}$	13.7	-20
VC _{PLS, 2CP}	$[9.6 \pm 0.6] \times 10^{-4}$	2.6	-6.7	$[4.3 \pm 0.6] \times 10^{-4}$	5.9	-7.5

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (VC_{ip}), y de la intensidad de corriente entre +0.20 y +0.70 V eligiendo 1 (VC_{PLS, 1CP}) o 2 variables latentes (VC_{PLS, 2CP}) para construir el modelo de calibración PLS.

^b %RSD: desviación estándar relativa.

^c %Error relativo calculado como $(C_{Px} - C_{estimada}) \times 100 / C_{Px}$, donde C_{Px} es la concentración teórica de adrenalina (C_{P1} o C_{P2}), y $C_{estimada}$ es la concentración de adrenalina estimada con cada método.

En una segunda etapa se llevó a cabo la calibración con los datos espectroscópicos. Teniendo en cuenta que se registró un espectro de absorción en la región UV/Visible cada 0.1 s, a lo largo de todo el barrido de potencial, se dispone de muchos datos que nos pueden suministrar información muy válida sobre los diferentes procesos y analitos generados durante la oxidación de adrenalina. Al ser muchos los productos de oxidación generados, compuestos que muestran picos de absorción muy solapados entre sí, como se ha descrito en el análisis por ICA y MCR-ALS presentado en el apartado 3.2.1, parece más acertado realizar un análisis multivariante de los

3. Resultados y discusión

datos espectroscópicos registrados, en lugar de un análisis univariante convencional. Este análisis multivariante se puede realizar desde dos puntos de vista diferentes.

En el primero se seleccionaron los espectros de absorción al potencial anódico más alto aplicado, +0.70 V. A este potencial la formación de todas las especies será la más alta, por lo que es esperable que los valores de absorbancia sean elevados y la sensibilidad del proceso sea superior. Una vez establecida este valor de potencial se eligió el rango de longitudes de onda entre 290 y 600 nm, cubriendo así los dos picos principales observados en los espectros de absorción (Figura 56.b). Al igual que con los datos electroquímicos, se realizó un análisis por componentes principales (PCA) de la matriz de datos construida, obteniéndose que nuevamente dos componentes principales parecen ser necesarias para explicar todos los procesos observados en estos experimentos espectroelectroquímicos.

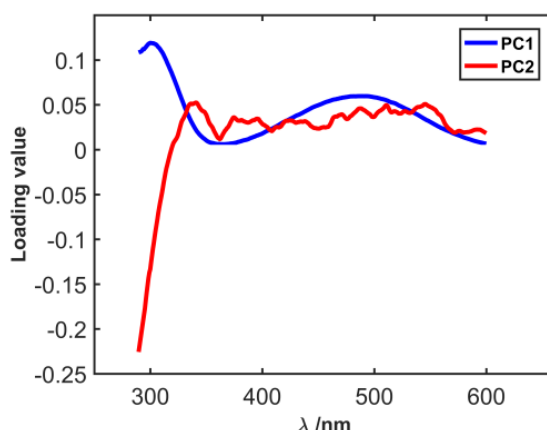


Figura 58. Valores de los loadings tras realizar Análisis por Componentes Principales (PCA) de los espectros de absorción a +0.70 V entre 290 y 600 nm para el conjunto de patrones de adrenalina con concentración comprendida entre 7.0×10^{-5} hasta 7.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V. $v = 0.05$ V \times s $^{-1}$.

La Figura 58 muestra los loadings de las dos primeras variables latentes, pudiéndose diferenciar dos contribuciones diferentes a los espectros de absorción registrados durante la oxidación de la adrenalina, una de una serie de compuestos con dos máximos de absorción a 300 y 485 nm y una segunda de aquellos con un máximo

de absorción a longitudes de onda inferiores a 290 nm, pero que mayoritariamente explica el ruido de las experiencias realizadas. Se realizó la regresión PLS teniendo en cuenta únicamente la primera variable latente (primera línea, Tabla 11) y las dos variables latentes (segunda línea, Tabla 11). A diferencia de cómo se apreció con los datos electroquímicos, en este caso, la regresión realizada con las dos primeras variables latentes empeora los parámetros característicos de las rectas de calibrado.

Tabla 11. Parámetros característicos obtenidos de los modelos de regresión realizados con los datos espectroscópicos de las experiencias espectroelectroquímicas realizadas en el rango de concentraciones de adrenalina entre 3×10^{-5} a 7×10^{-3} M mostrados en la Figura 56.

MÉTODO ^a	SENSIBILIDAD ^c (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL (S_{yx})	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
A ₁	1.1340 a.u. M ⁻¹	-1.28×10^{-7} a.u.	1.30×10^{-4}	0.9951	4×10^{-5}
A ₂	0.9934 a.u. M ⁻¹	1.23×10^{-5} a.u.	1.92×10^{-4}	0.9934	6.5×10^{-4}
A ₃	0.9951 a.u. M ⁻¹	5.73×10^{-6} a.u.	1.14×10^{-4}	0.9951	
A ₄	0.9992 a.u. M ⁻¹	1.61×10^{-5} a.u.	4.07×10^{-5}	0.9995	5.0×10^{-5}

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de absorbancia a +0.70 V entre 290 y 600 nm eligiendo 1 (A₁) o 2 variables latentes (A₂) y de absorbancia entre +0.20 y +0.70 V entre 290 y 600 nm eligiendo 1 (A₃) o 2 variables latentes (A₄) para construir el modelo de calibración PLS.

^b $y = a + b \times C_{\text{adrenalina}}$.

Este empeoramiento está también patente en la estimación de la concentración de las dos muestras problema preparadas con concentraciones de 9×10^{-4} M y 4×10^{-4} M, Tabla 12, donde aumentan todos los parámetros analizados, %RSD, el error relativo que se duplica, y la amplitud del intervalo de confianza. Por lo tanto con este criterio y conjunto de datos, parece claro que el análisis más acertado de los datos y la estimación más correcta de los datos es a partir del modelo de calibración construido teniendo en cuenta únicamente una variable latente.

3. Resultados y discusión

Tabla 12. Concentración estimada a partir de los modelos de regresión mostrados en la Tabla 11.

MÉTODO ^a	$C_{P1} = 9 \times 10^{-4} \text{ M}$			$C_{P2} = 4 \times 10^{-4} \text{ M}$		
	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c	Intervalo de confianza /M	%RSD ^b ($\alpha = 0.05$)	%Error relativo ^c
A ₁	$[10 \pm 3.0] \times 10^{-4}$	12.3	-11.1	$[5.0 \pm 3.0] \times 10^{-4}$	24.0	-25.0
A ₂	$[7.0 \pm 4.0] \times 10^{-4}$	47.0	22.2	$[2.0 \pm 5.0] \times 10^{-4}$	47.2	50.0
A ₃	$[10 \pm 3.0] \times 10^{-4}$	12.3	-11.1	$[5.0 \pm 3.0] \times 10^{-4}$	24.1	-25.0
A ₄	$[9.0 \pm 1.0] \times 10^{-4}$	4.8	0.0	$[5.0 \pm 1.0] \times 10^{-4}$	8.5	-25.0

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de absorbancia a +0.70 V entre 290 y 600 nm eligiendo 1 (A₁) o 2 variables latentes (A₂) y de absorbancia entre +0.20 y +0.70 V entre 290 y 600 nm eligiendo 1 (A₃) o 2 variables latentes (A₄) para construir el modelo de calibración PLS.

^b %RSD: desviación estándar relativa.

^c %Error relativo calculado como $(C_{Px} - C_{estimada}) \times 100 / C_{Px}$, donde C_{Px} es la concentración teórica de adrenalina (C_{P1} o C_{P2}), y $C_{estimada}$ es la concentración de adrenalina estimada con cada método.

Existe un segundo modo de abordar la resolución cuantitativa de un problema tan complejo como este y consiste en seleccionar los espectros de absorción, no solo al potencial más anódico aplicado, si no eligiendo los espectros a todos los potenciales donde en el voltamperograma observamos cambios de corriente relacionados con el proceso de oxidación de la adrenalina. Este segundo modelo se construyó eligiendo los espectros de absorción de todos los patrones preparados entre 290 nm y 600 nm en el rango de potenciales comprendido entre +0.20 y +0.70 V. Para ello es necesario crear una matriz de variables respuesta compuesta por los espectros a diferentes potenciales, así para cada concentración se obtiene una línea en la matriz respuesta que está formada por tantos espectros como potenciales se hayan elegido. Por ejemplo, en este caso se ha utilizado una respuesta para cada concentración

compuesta por 101 potenciales y 199 longitudes de onda, dando lugar a un vector de longitud 20099, y finalmente el modelo está construido con 11 concentraciones, dando lugar a una matriz de tamaño 11x20099, es decir, 221089 valores de absorbancia, que permiten obtener una información más completa del sistema.

En la Tabla 11 y Tabla 12 se presentan los modelos de calibración y las estimaciones de la concentración de las dos disoluciones problema preparadas, respectivamente, eligiendo una sola variable latente o dos variables latentes. Como se puede ver en este caso, ampliando el rango de potenciales seleccionados para construir la matriz de absorbancias se tiene una significativa mejora en los parámetros de calibración y en la estimación de la concentración de adrenalina trabajando con 2 variables latentes. Este resultado indica que teniendo en cuenta toda la información suministrada por una experiencia espectroelectroquímica podemos construir modelos de calibración más fiables, robustos y que son capaces de estimar de una forma significativamente más correcta la concentración de una disolución problema de adrenalina, en este caso.

3.3 ESTUDIO ESPECTROELECTROQUÍMICO DE L-DOPA

3.3.1 ESPECTROELECTROQUÍMICA DE LA ELECTROXIDACIÓN DE L-DOPA.

Por último, se abordó el estudio del mecanismo de oxidación de la L-dopa en medio neutro utilizando técnicas espectroelectroquímicas de absorción en el UV/Vis. Para ello se realizaron una serie de experiencias mediante voltamperometría cíclica entre -0.50 V y +0.70 V, analizando el efecto en las respuestas espectroelectroquímicas tanto de la concentración de L-dopa como de la velocidad de barrido. Se realizaron 3 barridos de potencial consecutivos a $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ o $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. Además se trabajó con diferentes concentraciones, centrándose el siguiente análisis en la comparación entre dos concentraciones que reflejan los diferentes comportamientos observados. En concreto, se han elegido como experimentos representativos los realizados a las concentraciones de L-dopa en medio neutro (PBS, pH = 7) de $0.5 \times 10^{-3} \text{ M}$ y $3.0 \times 10^{-3} \text{ M}$.

3. Resultados y discusión

Las señales registradas para la experiencia realizada con la disolución de L-dopa 0.5×10^{-3} M y una velocidad de barrido de $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$ se presenta en la Figura 59.

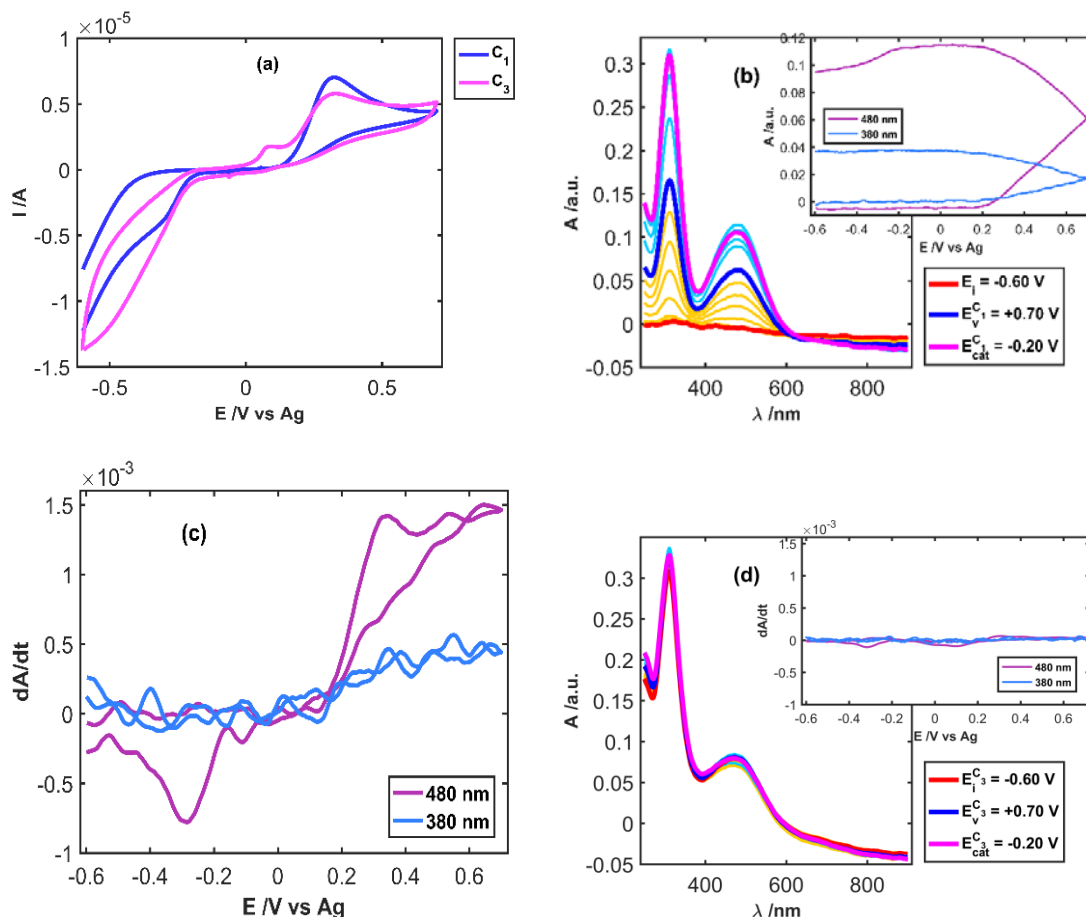


Figura 59 (a) Voltamperogramas durante el 1^{er} y 3^{er} barrido de potencial de L-dopa (b) Evolución de los espectros de absorción durante el 1^{er} barrido de potencial Inset: voltabsorciogramas a 380 nm y 480 nm. (c) Voltabsorciogramas derivados correspondientes al 1^{er} barrido de potencial a 380 nm y 480 nm. (d) Evolución de los espectros de absorción durante el 3^{er} barrido de potencial Inset: voltabsorciogramas derivados correspondientes al 3^{er} barrido de potencial a 380 nm y 480 nm. $C_{\text{L-dopa}} = 0.5 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = -0.60 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = +0.70 \text{ V}$, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

El voltamperograma obtenido en estas condiciones de trabajo (Figura 59.a) presenta un pico de oxidación irreversible centrado en $+0.27 \text{ V}$, pico que va decreciendo con el número de barridos realizados. Al no observarse el correspondiente

pico de reducción se puede concluir que el producto de oxidación de la L-dopa, la dopaquinona, está implicado en otras reacciones químicas acopladas que lo degradan de forma irreversible. En el barrido catódico se observa una corriente de reducción que debería estar relacionada con la reducción de alguno de los productos de oxidación generados en el barrido anódico. En el tercer barrido registrado se puede ver la aparición de un nuevo pico irreversible de oxidación a +0.09 V. La aparición de este pico a un potencial menor que el atribuido a la oxidación de la L-dopa a dopaquinona, está relacionado con la formación de un producto de oxidación que es oxidado más fácilmente que la L-dopa. Tal y como se describe en bibliografía, este pico parece estar relacionado con el leucodopacromo que se oxida a dopacromo [185].

Analizando la evolución de los espectros en el primer barrido cíclico de potencial (Figura 59.b), se puede apreciar la aparición de dos bandas de absorción situadas en 310 y 480 nm, relacionados con alguno de los productos de oxidación de la L-dopa. Según la bibliografía, en la oxidación tiene lugar básicamente la formación del dopacromo [185]. Hay un aspecto destacable en el comportamiento de los espectros de absorción en este primer ciclo. Durante gran parte del barrido anódico (líneas amarillas en Figura 59.b), las dos bandas que aparecen son muy claras y en torno a 380 nm la absorbancia es prácticamente cero.

En cambio durante el barrido catódico (líneas azules en Figura 59.b), la absorbancia a esta longitud de onda es más intensa. Analizando los voltabsorciogramas representados a estas dos longitudes de onda características, 380 y 480 nm (figura insertada en la Figura 59.b) se puede observar que las dos crecen de forma significativa entre +0.20 y 0.70 V en el barrido anódico, relacionándose por tanto con la oxidación de la L-dopa observada en el voltamperograma. Durante el barrido catódico la señal a 480 nm sigue creciendo hasta que se alcanza el potencial de +0.20 V, punto a partir del cual se mantiene constante hasta llegar un potencial de -0.20 V en el que comienza una ligera disminución que se prolonga hasta finalizar el barrido catódico. En cambio el voltabsorciograma a 380 nm crece en el barrido catódico hasta que se aplica un potencial de +0.20 V, punto a partir del cual la absorbancia permanece constante en un valor de 0.04 a.u. hasta finalizar el barrido voltamperométrico. Este

3. Resultados y discusión

comportamiento indica que la absorbancia a 380 nm está relacionada con una especie que se va acumulando en la disolución o sobre la superficie del electrodo.

Realizando la derivada de estos voltasorciogramas (Figura 59.c) se puede ver que la señal a 480 nm tiene cierta similitud con el voltamperograma correspondiente al primer barrido de potencial, representado en Figura 59.a, aunque el proceso de reducción se ve mucho más claro en la señal derivada de la absorbancia que en la señal electroquímica. En cambio el voltabsorciograma derivado a 380 nm solo muestra el crecimiento de la señal durante el barrido anódico, y su decrecimiento durante el catódico, solapándose ambos trazos. Estos comportamientos indican que se electrogeneran al menos dos productos de oxidación. Si analizamos ahora la evolución de los espectros durante el tercer barrido de potencial (Figura 59.d), se puede ver que prácticamente no hay variaciones, manteniéndose las bandas a 380 y 480 nm con un valor constante de absorbancia.

El proceso de oxidación de la L-dopa (Figura 18.a) implica la formación de dopaquinona en primera instancia, que sufre un proceso de ciclación intramolecular hasta leucodopacromo, pero se oxida inmediatamente hasta dopacromo. En los sucesivos barridos de potencial, el dopacromo participa en otra reacción química acoplada apareciendo compuestos de naturaleza indólica que provocan la formación de melanina, polímero que queda depositado sobre la superficie electródica, dando lugar a su pasivación [92,148,149]. Por lo tanto, el comportamiento observado en los espectros de absorción durante el tercer barrido de potencial puede estar relacionado con esta pasivación del electrodo por el depósito de compuestos tipo indol en la superficie del mismo.

Dado los diversos compuestos que pueden formarse durante la oxidación de L-dopa, y con el fin de identificarlos a partir de su espectro específico se ha realizado un tratamiento multivariante de los datos utilizando el mismo procedimiento descrito para la dopamina y la adrenalina. Este procedimiento supone realizar en primer lugar ICA [235–237] para determinar las variables más influyentes en el experimento. Esta primera aproximación fue el punto de partida para el análisis con MCR- ALS que actúa mejorando el ajuste del modelo tras cada iteración. El procedimiento concluye cuando

el algoritmo converge a un mínimo global que coincide con el punto en el que se encuentra la solución del sistema por mínimos cuadrados, deconvolucionando la señal original en las diferentes componentes que incluye.

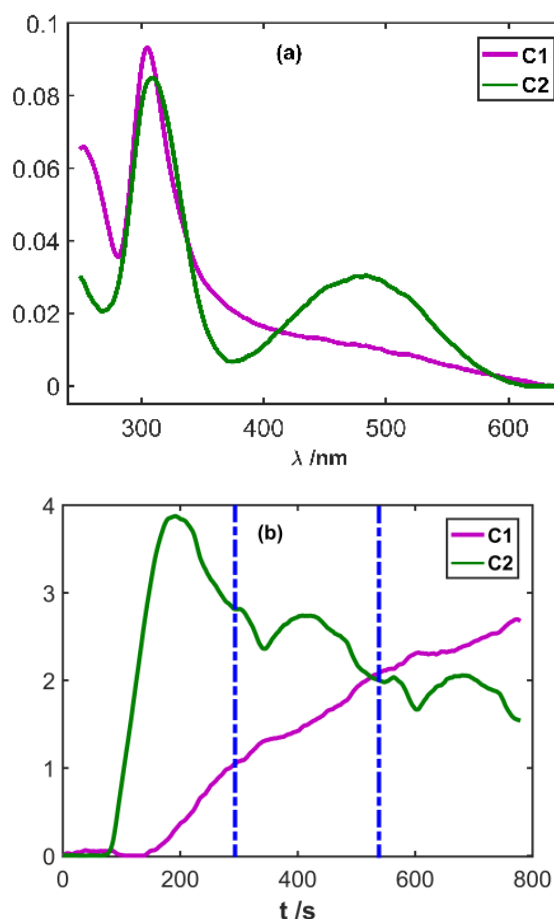


Figura 60. (a) MCR-ALS deconvolución espectral registrada durante la oxidación de L-dopa; (b) perfil de concentración vs tiempo para las especies resultas con MCR-ALS (las líneas azules marcan los tres barridos cíclicos de potencial realizados). $C_{L-dopa} = 0.5 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = -0.60$ V, $E_{final} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Se creó una matriz con los valores de absorbancia entre 250 y 650 nm correspondientes a tres barridos cíclicos de potencial entre -0.60 y +0.70 V. Los criterios de partida para el análisis ICA fueron seleccionar únicamente dos componentes, ya que se prevé que los compuestos mayoritarios sean dopaquinona y dopacromo. Tras esta primera aproximación se realizó el análisis multivariante con

3. Resultados y discusión

MCR-ALS, imponiendo el criterio de no negatividad tanto en los valores de concentración como de absorbancia, que permitió deconvolucionar los espectros de absorción originales en los espectros para esas dos componentes seleccionadas (Figura 60.a).

El espectro deconvolucionado correspondiente a la componente 1 (C_1) tiene un máximo de absorción en 305 nm y una cola de absorción que se prolonga hasta los 650 nm. Comparando este espectro con el de la componente 2 (C_2) se aprecian dos diferencias muy significativas: una banda de absorción en 480 nm relacionada con el dopacromo y un mínimo muy claro entre 370-380 nm que separa esta banda de la otra situada en 305 nm. La diferencia apreciada en esta región entre 370 y 380 nm para los espectros de estas dos componentes indica que en esa zona posiblemente absorba otro producto de oxidación de la L-dopa.

Analizando el perfil de concentraciones frente al tiempo (Figura 60.b), se pueden apreciar diferencias muy importantes en cuanto a la evolución a lo largo de los tres barridos cíclicos de potencial realizados.

El perfil de concentraciones de C_1 muestra como éste empieza a crecer al finalizar el primer barrido anódico (en torno a los 140 s correspondientes a +0.70 V aplicados), en cambio C_2 empieza a crecer a un potencial aproximado de +0.20 V en el primer barrido anódico (en torno a los 80 s de experimento). Esta segunda componente crece bruscamente hasta alcanzar un máximo en torno a los 200 s (correspondiente con el potencial de +0.20 V en el primer barrido catódico). A partir de ese momento se aprecia una disminución progresiva del perfil de concentración del compuesto relacionado con esta componente C_2 . En cambio el perfil de concentraciones de C_1 crece de forma continua en los siguientes barridos de potencial. Como se ha comentado anteriormente, la presencia de la banda en 480 nm indica que el compuesto relacionado con C_2 sea el dopacromo. Si este compuesto generado masivamente en el primer barrido de potencial disminuye en los siguientes quiere decir que va desapareciendo del medio de reacción de forma progresiva, y teniendo en cuenta que el perfil de C_1 crece continuamente, indica que el dopacromo se está convirtiendo en otra especie, probablemente por una reacción química acoplada, ya que ese

crecimiento observado en C_1 es independiente del potencial. Por lo tanto, conociendo el mecanismo de oxidación propuesto para la L-dopa (Figura 18), los compuestos relacionados con C_2 serían los derivados indólicos de la L-dopa que pasivan la superficie electródica. Por lo tanto la formación de dopaquinona no es posible detectarla en estas condiciones de trabajo, únicamente el dopacromo y los derivados indólicos de la L-dopa.

El comportamiento electroquímico y espectral de la L-dopa durante su oxidación, cuando se aumenta su concentración, tiene ciertas semejanzas al observado a concentraciones bajas, pero hay ciertas diferencias destacables. La Figura 61 muestra las señales registradas en una experiencia en la que la concentración de L-dopa se aumentó hasta 3.0×10^{-3} M y la velocidad de barrido se disminuyó hasta los $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, manteniendo el resto de condiciones experimentales idénticas a las mostradas en la Figura 59. La señal voltamperométrica (Figura 61.a) para el primer y tercer ciclo es similar a la registrada para la concentración de 0.5×10^{-3} M (Figura 59.a), siendo la intensidad de corriente cuatro veces mayor, lo que permite discriminar mejor el proceso de reducción en torno a -0.40 V . También se observa un desplazamiento del potencial de pico en todos los procesos apreciados a potenciales más anódicos los picos de oxidación y a más catódicos el pico de reducción.

En cuanto a los espectros registrados durante el primer barrido voltamperométrico, se pueden identificar nuevamente las dos bandas de absorción a 310 y 480 nm (Figura 61.b) que crecen durante la oxidación de la L-dopa entre $+0.20 \text{ V}$ del barrido anódico y $+0.20 \text{ V}$ del barrido catódico (Figura 61.c), estando relacionado este comportamiento con la oxidación de L-dopa hasta dopacromo. A partir de ese punto se aprecia un segundo aumento de absorbancia que se prolonga en el barrido catódico hasta alcanzar los -0.40 V . Este segundo tramo de aumento de absorbancia debe estar relacionado con una reacción química en la que participa el dopacromo. Este segundo proceso se puede visualizar a 380 nm, donde la absorbancia crece de forma progresiva prácticamente durante todo el barrido catódico.

3. Resultados y discusión

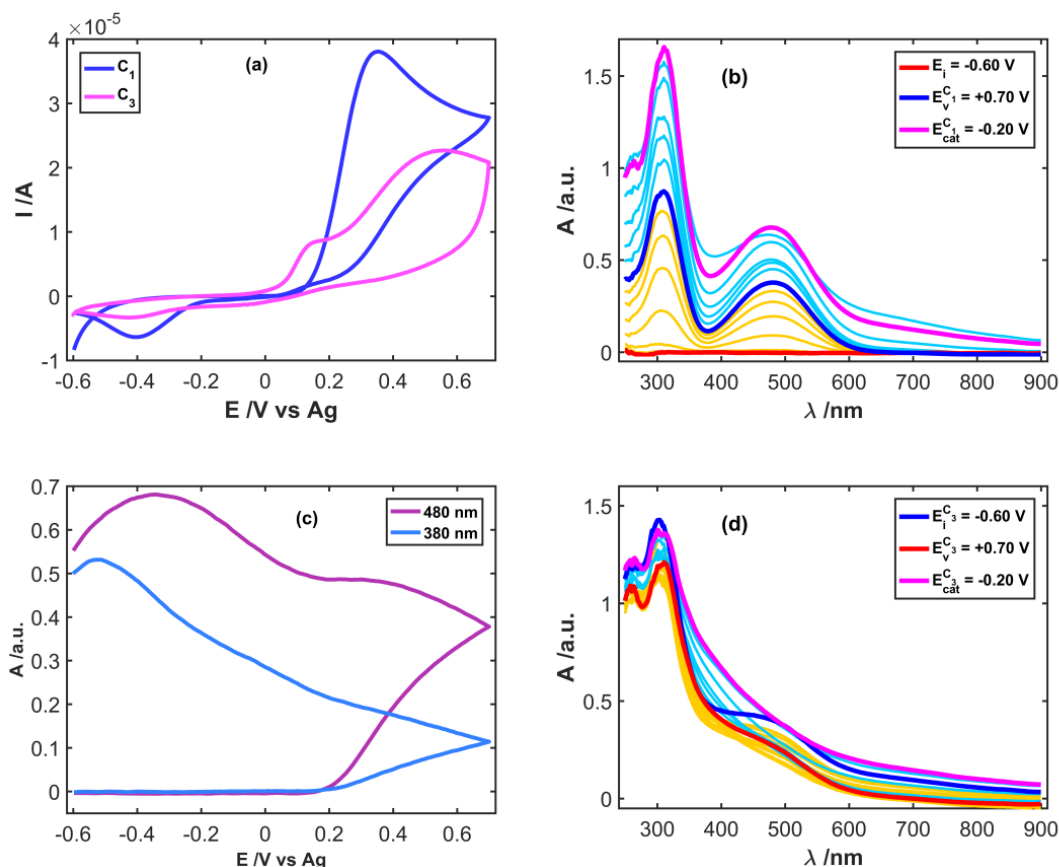


Figura 61 (a) Voltamperogramas durante el 1^{er} y 3^{er} barrido de potencial de L-dopa (b) Evolución de los espectros de absorción durante el 1^{er} barrido de potencial. (c) Voltabsorciogramas derivados correspondientes al 1^{er} barrido de potencial a 380 nm y 480 nm. (d) Evolución de los espectros de absorción durante el 3^{er} barrido de potencial $C_{L-dopa} = 3.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = -0.60$ V, $E_{final} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = 0.005 V \times s⁻¹.

Los cambios más significativos se dan en la forma y evolución de los espectros en el tercer barrido de potencial (Figura 61.d). La banda de absorción de 480 nm termina por desaparecer quedando solapada por la cola de banda de absorción centrada en 300 nm. Además se puede ver que la forma del espectro no varía de forma destacable a lo largo de todo este barrido de potencial, indicando que la superficie se ha modificado con un compuesto cuyo espectro es prácticamente el mismo indistintamente de la aplicación de potenciales anódicos o catódicos. Este segundo proceso, tal y como se ha concluido en las condiciones mostradas en la Figura 59 y en los resultados tras el tratamiento multivariante de los datos con ICA y MCR-ALS, debe

estar relacionado con la formación de compuestos indólicos que terminan pasivando la superficie electródica.

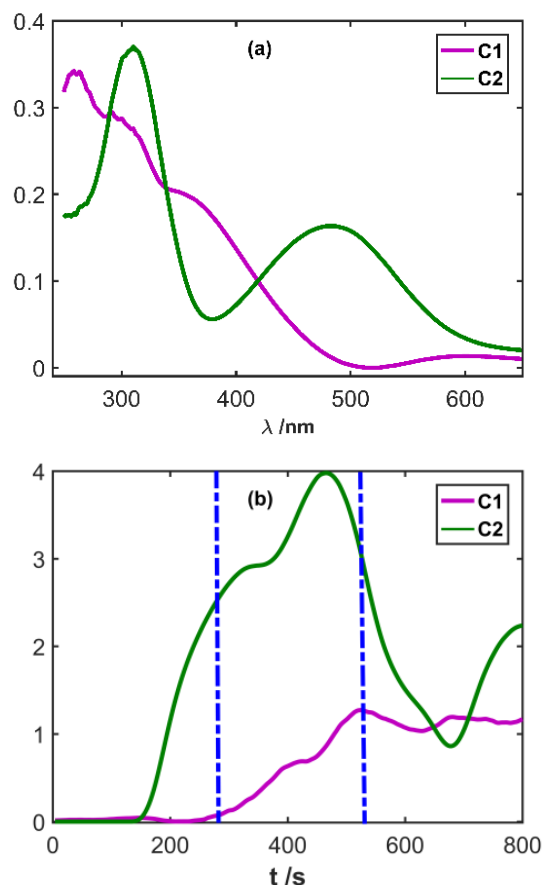


Figura 62. (a) MCR-ALS deconvolución espectral registrada durante la oxidación de L-dopa; (b) perfil de concentración vs tiempo para las especies resultas con MCR-ALS (las líneas azules marcan los tres barridos cíclicos de potencial realizados). $C_{L-dopa} = 3.0 \times 10^{-3}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = -0.60$ V, $E_{final} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = 0.005 V \times s $^{-1}$.

Así, de nuevo se realizó el análisis multivariante de esta experiencia electroquímica con ICA y MCR-ALS, utilizando los mismos criterios que los indicados para la experiencia a 0.01 V \times s $^{-1}$ (Figura 59). La Figura 62.a muestra los espectros deconvolucionados para las dos componentes. El espectro de la componente 2 (C_2) es muy similar al deconvolucionado para esta misma componente en la experiencia mostrada en la Figura 60, espectro relacionado con el dopacromo. Los

3. Resultados y discusión

cambios más importantes se dan en el espectro deconvolucionado correspondiente a la componente 1 (C_1). En este caso se ven hasta tres bandas solapadas entre 250 y 500 nm, situadas aproximadamente en 260, 300 y 360 nm.

El perfil de concentraciones de esta primera componente (Figura 62.b) muestra como éste empieza a aumentar durante el primer barrido catódico hasta finalizar el segundo barrido cíclico de potencial, para permanecer constante a partir de ese momento. Este resultado parece indicar que el recubrimiento de la superficie electródica con los derivados indólicos de la L-dopa ha concluido al finalizar este segundo barrido. Este hecho, que no se llega a producir para la experiencia anterior, se debe a que se ha aumentado la concentración desde 0.5×10^{-3} M a 3.0×10^{-3} M, por lo que se produce mucho más dopacromo y por lo tanto, la reacción química acoplada se desplaza más hacia la formación de esos productos indólicos. Además, existe una clara contribución de la velocidad de barrido a este comportamiento ya que su valor se ha disminuido a la mitad, hasta $0.005 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, aumentando el tiempo de generación del dopacromo y su posterior reacción hasta los productos indólicos.

Como conclusión general a este estudio espectroelectroquímico del mecanismo de reacción de oxidación de la L-dopa se puede asegurar que la concentración de este neurotransmisor y la velocidad de barrido seleccionada son condiciones que determinan de forma clara el tipo de productos generados. Así, si la concentración es elevada y la velocidad de barrido baja, se favorecerá la aparición rápida de los derivados índoles finales cuya estabilidad es tan alta que lleva acompañada la pasivación e inutilización del electrodo. Este comportamiento no llega a ser observado de forma tan clara a bajas concentraciones y velocidades de barrido más elevadas.

Por tanto, para poder realizar una determinación espectroelectroquímica de L-dopa, se decide realizar un solo barrido de oxidación hasta un potencial aplicado de +0.70 V, en el rango de longitudes de onda que más información contiene sobre este proceso de oxidación, comprendido entre 290 nm y 600 nm. De este modo se evita la formación de los derivados indólicos que conllevaría una incorrecta determinación de la L-dopa.

3.3.2 DETERMINACIÓN ESPECTROELECTROQUÍMICA DE L-DOPA.

Como se ha demostrado ya en el análisis de dopamina y adrenalina, las respuestas obtenidas a partir de experimentos espectroelectroquímicos de absorción en el UV-Vis contienen valiosa información cuantitativa sobre el analito estudiado. Con el objetivo de determinar cuantitativamente L-dopa a través del seguimiento espectroelectroquímico de su oxidación se preparó y midió un conjunto de 13 muestras de calibración donde se varió la concentración de L-dopa en medio neutro (PBS, pH = 7) entre 2.0×10^{-5} M y 5.0×10^{-3} M. Tras las conclusiones extraídas del análisis realizado en el apartado 3.3.1, se realizaron voltamperometrías lineales entre 0.00 V y +0.70 V a una velocidad de barrido de $0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

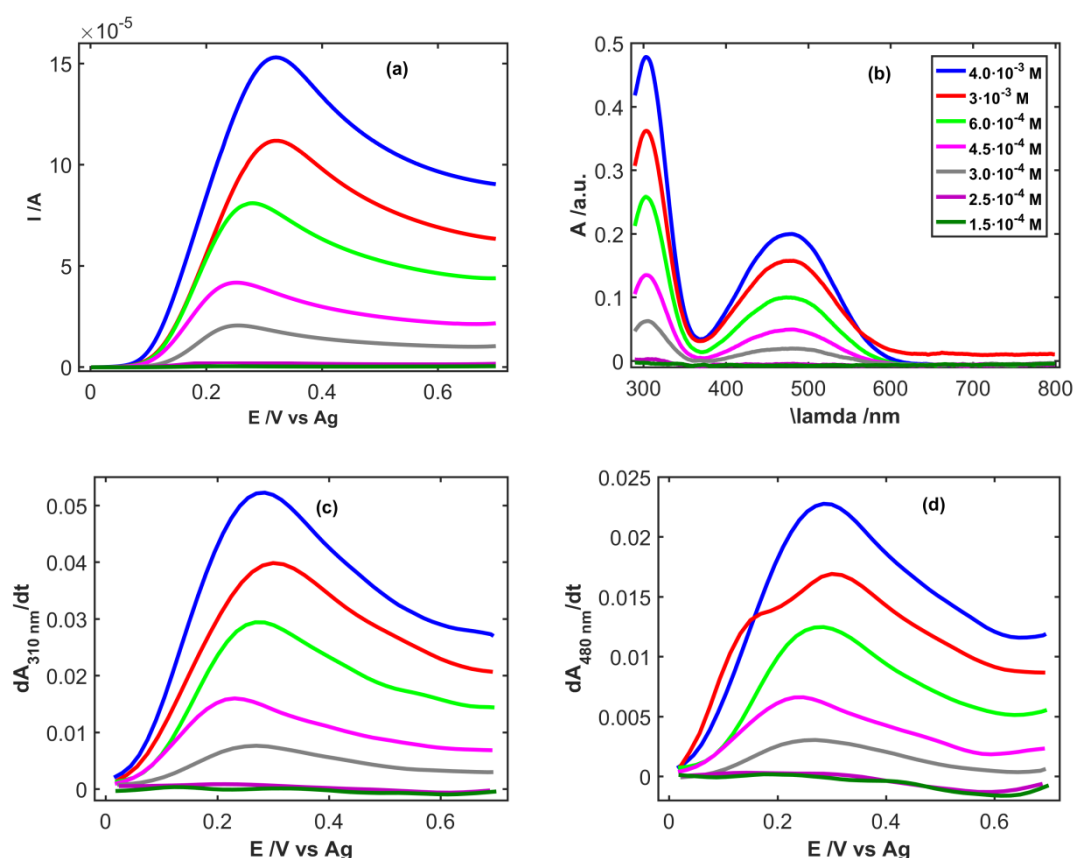


Figura 63. (a) Voltamperogramas lineales, (b) espectros de absorción cuando el potencial aplicado es de +0.70 V, (c) voltabsorciogramas derivados a 310 nm, y (d) voltabsorciogramas derivados a 480 nm. Patrones de L-dopa con concentración comprendida entre 2.0×10^{-5} hasta 5.0×10^{-3} M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = 0.00 \text{ V}$, $E_{final} = +0.70 \text{ V}$. $v = 0.05 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

3. Resultados y discusión

En la Figura 63 se presentan las señales electroquímicas (voltamperogramas) y ópticas (espectros y voltabsorciogramas derivados) registradas a algunas de las concentraciones elegidas en el conjunto de calibración. Como se puede ver, en los voltamperogramas lineales (Figura 63.a) se visualiza un único pico de oxidación a potenciales entre +0.20 y +0.30 V, relacionado con la oxidación de la L-dopa, pico que crece con la concentración de este neurotransmisor. Por otro lado, en el potencial vértice de estos barridos voltamperométricos, +0.70 V, los espectros registrados para las diferentes concentraciones muestran dos bandas de absorción a 310 y 480 nm, relacionadas, tal y como se ha explicado en el apartado 3.3.1, con la formación del dopacromo (Figura 63.b), bandas que igualmente crecen con la concentración de L-dopa en el medio de reacción.

Tabla 13. Parámetros característicos obtenidos de los modelos de regresión realizados con los datos electroquímicos de las experiencias espectroelectroquímicas realizadas en el rango de concentraciones de L-dopa entre 2.0×10^{-5} a 5.0×10^{-3} M mostrados en la Figura 63.

MÉTODO ^a	SENSIBILIDAD ^c (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	DESVIACIÓN ESTÁNDAR RESIDUAL (S_{yx})	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)	LÍMITE DE DETECCIÓN (M)
VC	0.039 A M^{-1}	$7.89 \times 10^{-7} \text{ A}$	4.9×10^{-6}	0.9942	3.2×10^{-5}
A_1	$1.093 \text{ a.u. M}^{-1}$	$-6.89 \times 10^{-5} \text{ a.u.}$	7.10×10^{-5}	0.9984	4.3×10^{-5}
dA_1	1.017 s M^{-1}	$-2.25 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$	4.22×10^{-5}	0.9993	1.9×10^{-4}

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (VC), de la absorbancia entre 290 y 600 nm (A_1) cuando el potencial aplicado es +0.70 V, y de la derivada de la absorbancia entre 290 y 600 nm (dA_1) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^b $y = a + b \times C_{\text{L-dopa}}$

En primer lugar se construyó un modelo de calibración por regresión por mínimos cuadrados (OLSR) con los datos electroquímicos, eligiendo la intensidad de corriente de pico en cada uno de los voltamperogramas como variable dependiente. Previa a la construcción de este modelo se realizó una regresión robusta por mínima

mediana de cuadrados (LMSR) para detectar puntos anómalos, y así eliminarlos del modelo de regresión final. En la Tabla 13 (primera línea), se muestran los parámetros característicos del modelo construido con los datos electroquímicos (VC), el cual se utilizó para estimar la concentración de una disolución problema de L-dopa (Tabla 14). Se puede comprobar la elevada exactitud en la determinación de la concentración de la disolución problema, pero la incertidumbre de esta estimación es relativamente alta dada la amplitud del intervalo de confianza obtenido.

Tabla 14. Concentración estimada a partir de los modelos de regresión mostrados en la Tabla 13,

MÉTODO ^a	$C_{P1} = 1.50 \times 10^{-3} \text{ M}$		
	INTERVALO DE CONFIANZA /M	%RSD ^b ($\alpha=0.05$)	%ERROR RELATIVO ^c
VC	$[1.5 \pm 0.3] \times 10^{-3}$	8.7	0.0
A ₁	$[1.45 \pm 0.16] \times 10^{-3}$	4.7	3.3
dA ₁	$[1.58 \pm 0.11] \times 10^{-3}$	2.8	-4.7

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de adrenalina de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (VC), de la absorbancia entre 290 y 600 nm (A₁) cuando el potencial aplicado es +0.70 V, y de la derivada de la absorbancia entre 290 y 600 nm (dA₁) cuando el potencial aplicado es +0.70 V. ^b %RSD: desviación estándar relativa.

^c %Error relativo calculado como $(C_{P1} - C_{\text{estimada}}) \times 100 / C_{P1}$, donde C_{P1} es la concentración teórica de L-dopa, y C_{estimada} es la concentración de L-dopa estimada con cada método.

Por otro lado, se construyó un segundo modelo de calibración en este caso con una matriz de datos que incluía, para todas las disoluciones patrón preparadas, los valores de absorbancia entre 290 y 600 nm cuando el potencial aplicado es el potencial final de la experiencia, +0.70 V, modelo A₁ en la Tabla 13. El análisis multivariante de los datos con PLS muestra como la representación de los loadings de las dos primeras variables latentes (Figura 64.a), evidencian que únicamente la primera tiene información relativa al proceso de oxidación estudiado dada su gran parecido con el espectro del dopacromo (Figura 64.b), mientras que la segunda tiene únicamente

3. Resultados y discusión

información sobre el ruido de la medida realizada. La representación de los scores de la primera variable latente frente a la segunda (Figura 64.c) muestra una clara relación de la primera de estas variables con la concentración de L-dopa, apreciándose valores crecientes de los scores de esta primera variable con la concentración. A partir de estos datos se decidió construir el modelo de regresión utilizando estos valores de absorbancia utilizando una única variable latente, la relacionada con la generación de dopacromo, ya que como se ha podido observar en los estudios de mecanismo de reacción realizados en el apartado 3.3.1, en este primer ciclo de oxidación únicamente se genera en el medio de reacción este producto de oxidación cuyas bandas de absorción están centradas en 310 y 480 nm.

Como se puede ver en la Tabla 13, dos de los parámetros característicos de este modelo de calibración obtenido con la matriz de absorbancia (modelo A₁), como son el coeficiente de determinación y el límite de detección son similares a los obtenidos con el modelo electroquímico (VC),. La estimación de la disolución problema utilizada para determinar la capacidad de predicción de este modelo construido con valores de absorbancia mejora significativamente los valores obtenidos en la estimación con el modelo electroquímico (Tabla 14). La desviación estándar residual (%RSD) disminuye un 46%, y la incertidumbre en la determinación es prácticamente un 50% inferior.

En la Figura 63.c y Figura 63.d se presentan los voltabsorciogramas derivados a las dos longitudes de onda características donde están situados los máximos de absorción de los espectros mostrados en Figura 63.b, 310 y 480 nm. La forma de estas señales derivadas de la absorbancia muestran una forma muy similar a las señales voltamperométricas de la Figura 63.a, apreciándose en ambas longitudes de onda un aumento de la intensidad de los picos que emergen entre +0.20 y +0.30 V cuando aumenta la concentración de L-dopa en el medio de reacción. Por lo tanto, también las derivadas de la absorbancia a diferentes longitudes de onda se pueden utilizar para construir modelos de calibración que permitan predecir la concentración de disoluciones problema.

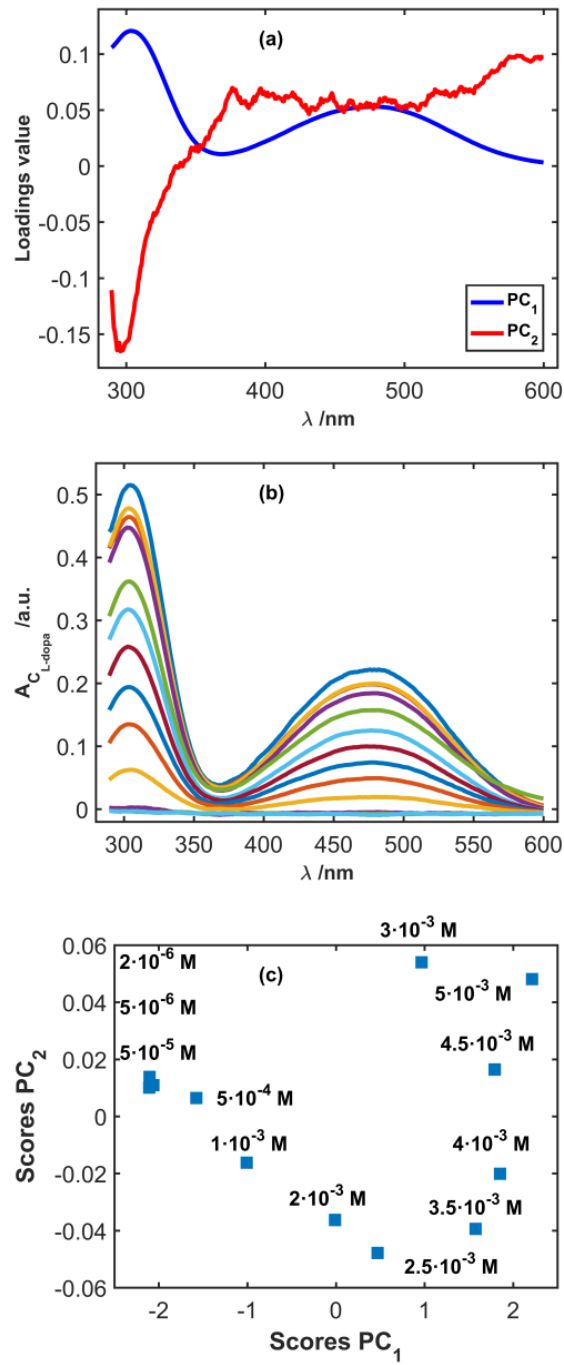


Figura 64. (a) Valores de los loadings, (b) representación de los espectros de absorción de las diferentes concentraciones de L-dopa utilizados en la construcción del modelo A_1 , y (c) representación de los scores obtenidos para las dos primeras variables latentes del modelo de calibración espectral construido con los valores de absorbancia entre 290 y 600nm.

3. Resultados y discusión

Para ello se construye una matriz con los valores de la derivada de la absorbancia con el tiempo a +0.70 V en la región de longitudes de onda comprendida entre 290 y 600 nm, las mismas condiciones que las utilizadas en el modelo de valores de absorbancia A_1 . Con esta matriz y realizando un tratamiento multivariante de los datos con PLS se obtienen unos valores de los loadings para las dos primeras variables latentes que reflejan de nuevo que únicamente la primera variable latente tiene la información más directamente relacionada con las señales derivadas de la absorbancia (Figura 65.a). Esta gran similitud se puede comprobar al comparar las señales de la derivada de la absorbancia a +0.70 V a las diferentes concentraciones utilizadas para construir el modelo en el rango de longitudes de onda indicado (Figura 65.b) con los loadings de esa primera variable latente (Figura 65.a). Por último, representando los scores de estas dos variables latentes se puede ver que únicamente la primera tiene una clara relación con la concentración de L-dopa (Figura 65.c).

Se calculó un tercer modelo de calibrado (dA_1) con los valores de las derivadas de la absorbancia a +0.70 V entre 290 y 600 nm, eligiendo una única variable latente. Los parámetros característicos de este modelo se presentan en la Tabla 13 y como se puede ver al compararlos con los de los otros dos modelos contruidos se mejora el coeficiente de determinación. El límite de detección en este caso es un orden de magnitud superior, debido claramente al ruido que llevan este tipo de señales derivadas y los valores tan bajos de las mismas (Figura 65.b). La estimación de la disolución problema de L-dopa (Tabla 14) muestra como disminuye tanto la incertidumbre en la determinación de la concentración de esta disolución como la desviación estándar residual. Se puede concluir que los tres modelos se pueden utilizar de una forma altamente fiable para determinar la concentración de una disolución problema de L-dopa.

En último lugar se realizó la comparación del modelo electroquímico (VC) con los dos modelos espectroscópicos para determinar si miden igual o hay diferencias entre ellos. Como ya se ha comentado en otros apartados de esta tesis, la IUPAC recomienda comparar los resultados de obtenidos con un nuevo método de análisis con un segundo método independiente [238]. Los experimentos espectroelectroquímicos proporcionan dos respuestas analíticas distintas e independientes, como ya se ha

demostrado, y a pesar de ello, la ausencia de sesgo ha de ser verificada comparando las estimaciones de los dos métodos elegidos (VC y A_1) y (VC y dA_1) mediante PLSR.

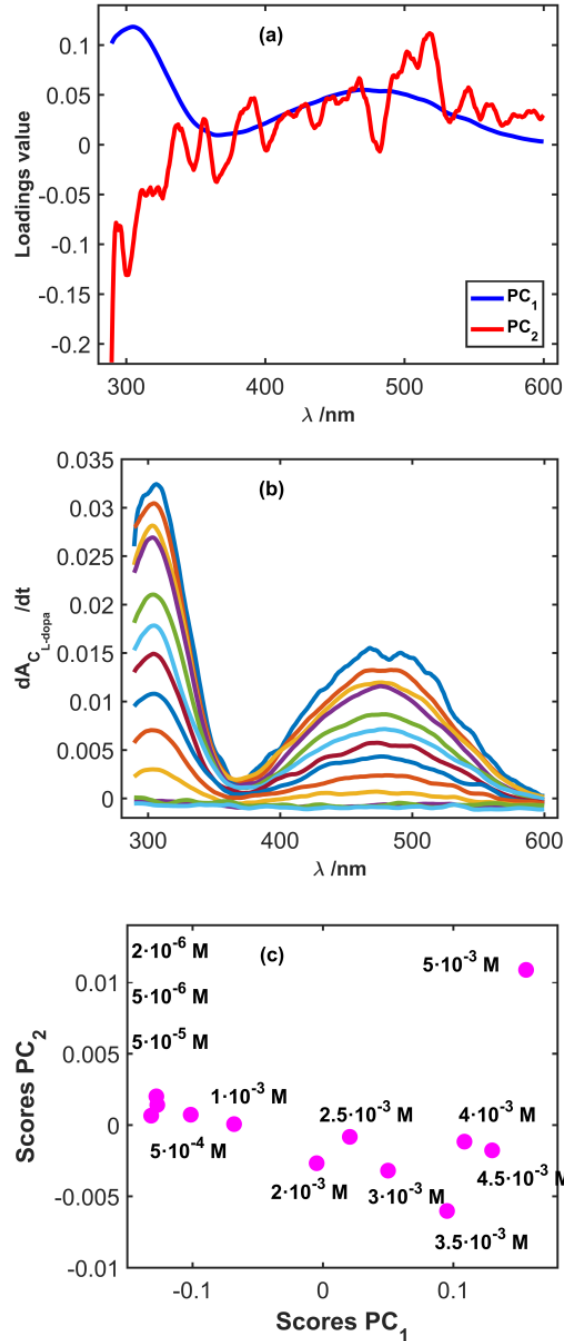


Figura 65. (a) Valores de los loadings, (b) representación de las derivadas de los espectros de absorción de las diferentes concentraciones de L-dopa utilizados en la construcción del modelo dA_1 , y (c) representación de los scores obtenidos para las dos primeras variables latentes del modelo de calibración espectral construido con los valores de absorbancia entre 290 y 600nm.

3. Resultados y discusión

Para ello se compararon dos a dos, las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico (VC) y cada uno de los dos métodos espectroscópicos presentados en la Tabla 13, A_1 y dA_1 . La Tabla 15 muestra los resultados obtenidos en las dos comparaciones posibles, apreciándose que en todos los casos se obtienen rectas en las que la pendiente tiene un valor de 1 y la ordenada de 0, concluyéndose que el método electroquímico y los espectroscópicos miden igual.

Tabla 15. Parámetros característicos obtenidos de la comparación de las estimaciones realizadas con el modelo electroquímico y uno de los dos modelos espectroscópicos mostrados en la Tabla 13.

MÉTODOS COMPARADOS ^a	INTERVALO DE LA PENDIENTE	INTERVALO DE LA ORDENADA EN EL ORIGEN /M	SENSIBILIDAD ^b (b)	ORDENADA EN EL ORIGEN ^b (a)	COEFICIENTE DE DETERMINACIÓN (R^2)
VC – A_1	1.00 ± 0.05	$(0.6 \pm 9.7) \times 10^{-5}$	0.9964	$6.0 \times 10^{-6} \text{ M}^{-1}$	0.9971
VC – dA_1	1.00 ± 0.03	$(0.06 \pm 5.20) \times 10^{-5}$	0.9996	$5.7 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1}$	0.9996

^a Los métodos indicados en la primera columna se refieren a la correlación con la concentración de L-dopa de la intensidad de pico anódico del voltamperograma (VC), de la absorbancia entre 290 y 600 nm (A_1) cuando el potencial aplicado es +0.70 V, y de la derivada de la absorbancia entre 290 y 600 nm (dA_1) cuando el potencial aplicado es +0.70 V.

^b $VC_{\text{predicción}} = a + b \times ESP_{\text{predicción}}$ (ESP se corresponde con el modelo A_1 o dA_1)

De entre todas estas comparaciones cabe destacar la segunda en la que se utilizan las estimaciones del método electroquímico y las del espectroscópico con las señales derivadas al ser el que mejor coeficiente de determinación tiene y menores intervalos de confianza para la pendiente y la ordenada en el origen. Por lo tanto queda demostrado que la espectroelectroquímica de absorción UV/Vis es una técnica autovalidada, que puede ser de vital importancia en el análisis cuantitativo.

3.4 RESOLUCIÓN ESPECTROELECTROQUÍMICA DE MEZCLAS

Un aspecto importante en análisis cuantitativo y que determina la utilidad de una técnica analítica es la posibilidad de estudiar no solo sistemas simples si no también complejos. Es decir, donde la potencia de una técnica queda demostrada no es en el estudio de un sistema con un único analito en el medio, si no cuando el sistema es una mezcla de especies difíciles de resolver debido al solapamiento de las señales registradas.

Para enfrentarse a este gran reto del campo del análisis, la espectroelectroquímica, y en este caso particular, la de absorción molecular en el UV/Vis, presenta grandes ventajas que pueden simplificar la cuantificación en sistemas altamente complejos. Por una parte el hecho de registrar dos señales simultáneamente puede ayudar a resolver estos sistemas, pero sin lugar a dudas, la característica más importante de este tipo de medidas es su carácter dinámico. Es decir, el sistema está cambiando de forma continua durante todo el experimento, y esa gran resolución temporal de las técnicas espectroelectroquímicas presentadas en esta tesis, es definitiva para la determinación cuantitativa de mezclas altamente complejas. A estas características hay que sumar un aspecto muy importante en análisis de sistemas químicos complejos, como es el carácter trilineal de las técnicas espectroelectroquímicas. En una experiencia espectroelectroquímica típica, por ejemplo voltamperométrica, se está variando de forma progresiva el potencial aplicado al sistema mientras se mide por un lado la corriente eléctrica y simultáneamente se están obteniendo los espectros de absorción en un rango determinado de longitudes de onda. Además, estas experiencias se realizan con disoluciones donde la concentración del analito o analitos a estudiar se varía con el fin de obtener relaciones lineales. Es decir, la absorbancia medida varía con la longitud de onda, con el potencial aplicado al sistema y con la concentración del analito o analitos estudiados, dando lugar a un típico sistema trilineal (Figura 66).

Este carácter trilineal de las técnicas espectroelectroquímicas de absorción en el UV/Vis con alta resolución temporal se ha utilizado en este caso para resolver dos mezclas muy complejas donde el grado de solapamiento de las respuestas de los

3. Resultados y discusión

diferentes analitos, tanto en las señales electroquímicas como espectroscópicas es bastante elevado.

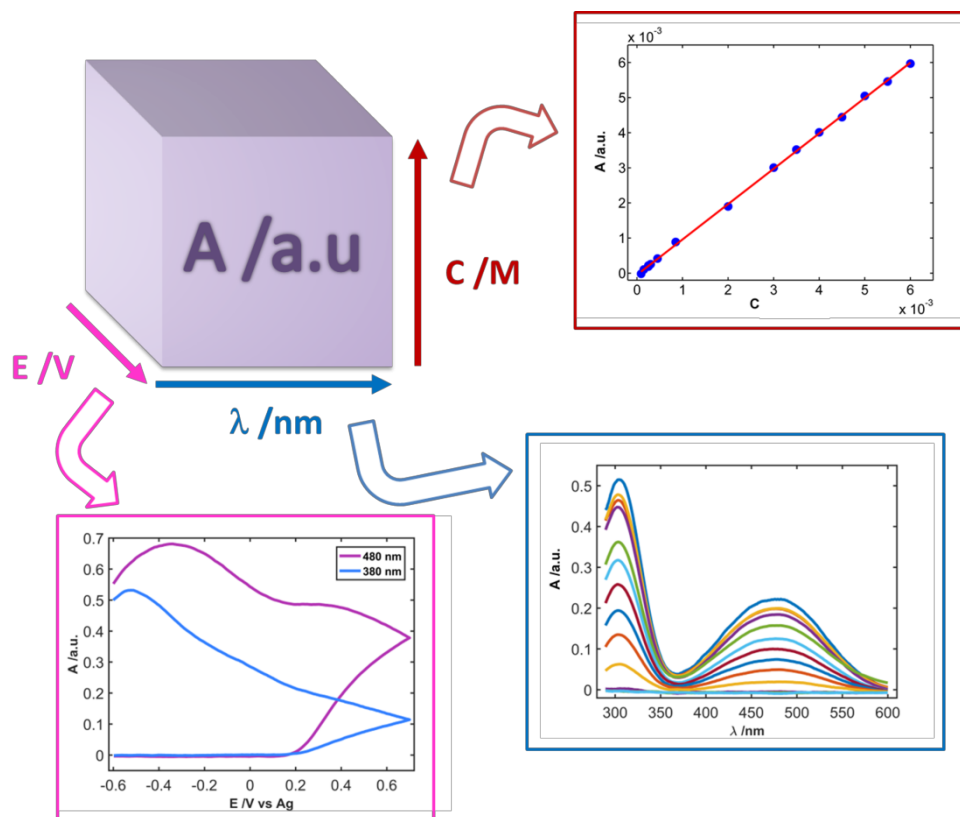


Figura 66. Esquema con el carácter trilineal de las técnicas espectroelectroquímicas de absorción en el UV/Vis.

Para ello se ha hecho uso de diferentes herramientas quimiométricas de análisis multivariante de datos, de extrema utilidad en estos casos, como son PLSR y PARAFAC.

3.4.1 MEZCLAS DE DOPAMINA Y L-DOPA

En este primer ejemplo se va a estudiar el caso de mezclas de dos neurotransmisores, la dopamina y la L-dopa. Estos dos neurotransmisores en medio neutro (PBS, pH = 7), estudiados en profundidad en los apartados 3.2.1, 3.1.2, 3.3.1 y 3.3.2 de esta tesis doctoral, tienen señales electroquímicas y espectroscópicas muy similares como muestra la Figura 67.

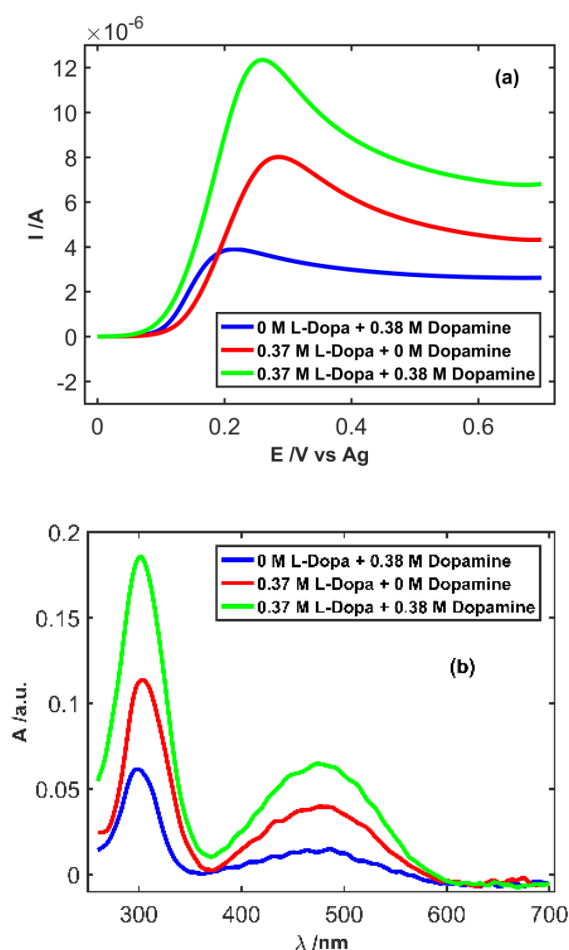


Figura 67. (a) Voltamperogramas lineales, y (b) espectros de absorción a +0.70 V. $C_{\text{dopamina}} = 3.8 \times 10^{-4}$ M, $C_{\text{L-dopa}} = 3.7 \times 10^{-4}$ M. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Los voltamperogramas lineales registrados entre 0.00 y +0.70 V a $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, para dos disoluciones de dopamina 3.8×10^{-4} M y L-dopa 3.7×10^{-4} M (Figura 67.a), presentan dos picos anódicos relacionados con la su oxidación situados en +0.22 V y +0.29 V, respectivamente. Esta separación de tan solo 0.07 V entre uno y otro pico, hace que una mezcla de ambos compuestos en concentraciones iguales de cada uno suponga la aparición de un solo pico en el voltamperograma situado en +0.26 V, haciendo muy difícil la resolución de mezclas de estos dos neurotransmisores utilizando únicamente técnicas voltamperométricas.

3. Resultados y discusión

Por otra parte, los espectros de absorción registrados al final del barrido de potencial, cuando el potencial aplicado es +0.70 V, muestran dos bandas de absorción relacionadas con la formación de la dopaminoquinona y dopaquinona por oxidación de dopamina y L-dopa, respectivamente (Figura 67.b). Estas bandas de absorción están situadas aproximadamente en 300 y 470 nm, para la dopamina, y en 305 y 480 para la L-dopa. El espectro de una mezcla equimolar de ambas especies presenta estos máximos situados en 302 y 475 nm. De nuevo estos resultados, hacen muy difícil resolver espectroscópicamente una disolución de estos dos neurotransmisores, eligiendo únicamente un único espectro de absorción.

Para tratar de resolver este problema analítico, se ha realizado un tratamiento multivariante de los datos, teniendo en cuenta que se registra un espectro de absorción en el rango UV/Vis por cada potencial aplicado al sistema. De modo que tenemos una matriz de datos espectroscópicos y electroquímicos con mucha más información de la que se puede extraer de una sola intensidad de pico anódico o de un solo espectro de absorción. El tratamiento multivariante utilizado en este caso, se realizó por una parte con los datos electroquímicos, es decir, con los valores de intensidad de corriente medidos a lo largo del voltamperograma registrado, y por otra parte con los datos de absorbancia medidos a diferentes potenciales y longitudes de onda. Así, denominaremos a los dos tratamientos multivariantes como modelo electroquímico y modelo espectroscópico, respectivamente. Se preparó un conjunto de muestras de calibrado en PBS (pH = 7) en el que se varió de forma aleatoria la concentración de dopamina y L-dopa (Tabla 16). Con cada una de ellas se realizó una experiencia electroquímica en la que el potencial se barrió entre 0.00 V y +0.70 V a una velocidad de $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$, utilizando para cada una de ellas un electrodo serigrafiado de carbono diferente.

Para el tratamiento de los datos se construyeron dos matrices de datos, cada una con un tipo de datos. Para la matriz con los datos electroquímicos se eligieron, para cada una de las 13 muestras de la Tabla 16, todas las intensidades de corriente medidas entre +0.10 V y +0.45 V, rango de potenciales en el que aparecen los diferentes picos anódicos, dando lugar a un total de 382 puntos por experimento. El tamaño de esta matriz con datos electroquímicos es pues de 4966 puntos. Para la

matriz de datos espectroscópicos se eligieron, para cada una de las 13 muestras de la Tabla 16, espectros de absorción comprendidos entre 290 y 600 nm a 176 potenciales diferentes, situados entre +0.10 V y +0.45 V. Es decir, para cada uno de los patrones de calibración se tiene un vector de 35024 valores de absorbancia. En total esta matriz de datos absorciométricos tiene un tamaño de 455312 puntos.

Tabla 16. Conjunto de muestras de calibrado para resolver la mezcla de dopamina y L-dopa.

MUESTRA	$C_{L-DOPA} \times 10^{-3} \text{ (M)}$	$C_{DOPAMINA} \times 10^{-3} \text{ (M)}$
M1	0.00	0.00
M2	0.00	0.00
M3	0.00	0.11
M4	0.00	0.38
M5	0.10	0.00
M6	0.10	0.11
M7	0.10	0.38
M8	0.37	0.00
M9	0.37	0.11
M10	0.75	0.11
M11	0.75	0.38
M12	0.75	0.77
M13	0.90	0.00
MP	0.37	0.38

Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$

V, $E_{\text{final}} = +0.70 \text{ V}$, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Con estas matrices de datos se construyeron dos modelos de calibración realizando *Partial Least Squares Regression* (PLSR), uno con los datos electroquímicos y otro con los datos espectroscópicos. La Figura 68 presenta los valores de los loadings obtenidos con cada uno de los modelos seleccionando las dos primeras variables latentes, ya que son el número de analitos presentes en nuestras muestras patrón.

3. Resultados y discusión

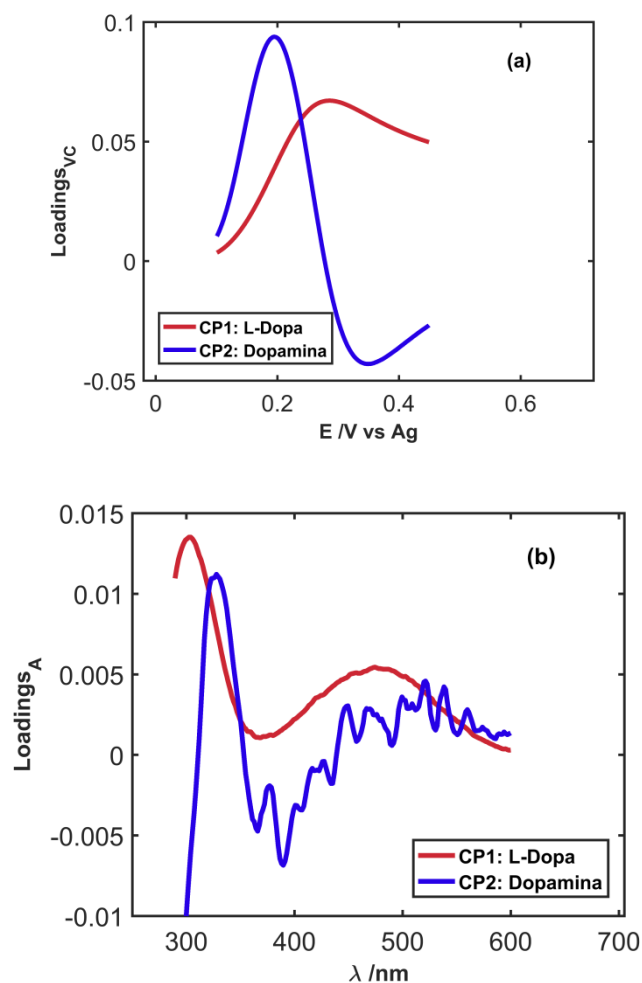


Figura 68. Valores de lo loadings obtenidos al construir los modelos de calibración con PLSR al deconvolucionar la matriz de datos (a) electroquímicos y (b) espectroscópicos para los patrones de calibrado de dopamina y L-dopa presentados en la Tabla 16. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00 \text{ V}$, $E_{\text{final}} = +0.70 \text{ V}$, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Al comparar los valores de los loadings del modelo electroquímico para estas dos variables latentes (Figura 68.a) con los voltamperogramas presentados en la Figura 67.a, se puede comprobar que el modelo construido explica y separa correctamente la contribución de cada uno de los dos neurotransmisores de la mezcla. Así, la primera variable latente que aparece presenta una señal con un pico en torno a +0.29 V que se relaciona con el voltamperograma registrado para la L-dopa, mientras que la segunda variable latente con un pico en torno a +0.20 V se relaciona con el voltamperograma de la dopamina. Por otra parte, al comparar los loadings del modelo

espectroscópico frente a la longitud de onda para las dos variables latentes seleccionadas (Figura 68.b) con los espectros mostrados en la Figura 67.b, se puede asegurar que igualmente este segundo modelo también explica la contribución de la dopamina y L-dopa a las señales espectrales, siendo más ruidosa la señal relacionada con la dopamina. Cabe destacar que los modelos ajustados explican las diferencias en el espectro, es decir, las longitudes de onda que son capaces de discriminar los dos compuestos a los diferentes potenciales. Una vez asignada cada variable latente a cada uno de los componentes de la mezcla se realizó la regresión lineal por mínimos cuadrados (OLSR) de las predicciones de cada modelo con sus respectivas variables latentes con la concentración del analito con el que se relaciona. Los modelos construidos para los datos electroquímicos y para los datos espectroscópicos, se presentan en la Figura 69.a y 69.b, respectivamente.

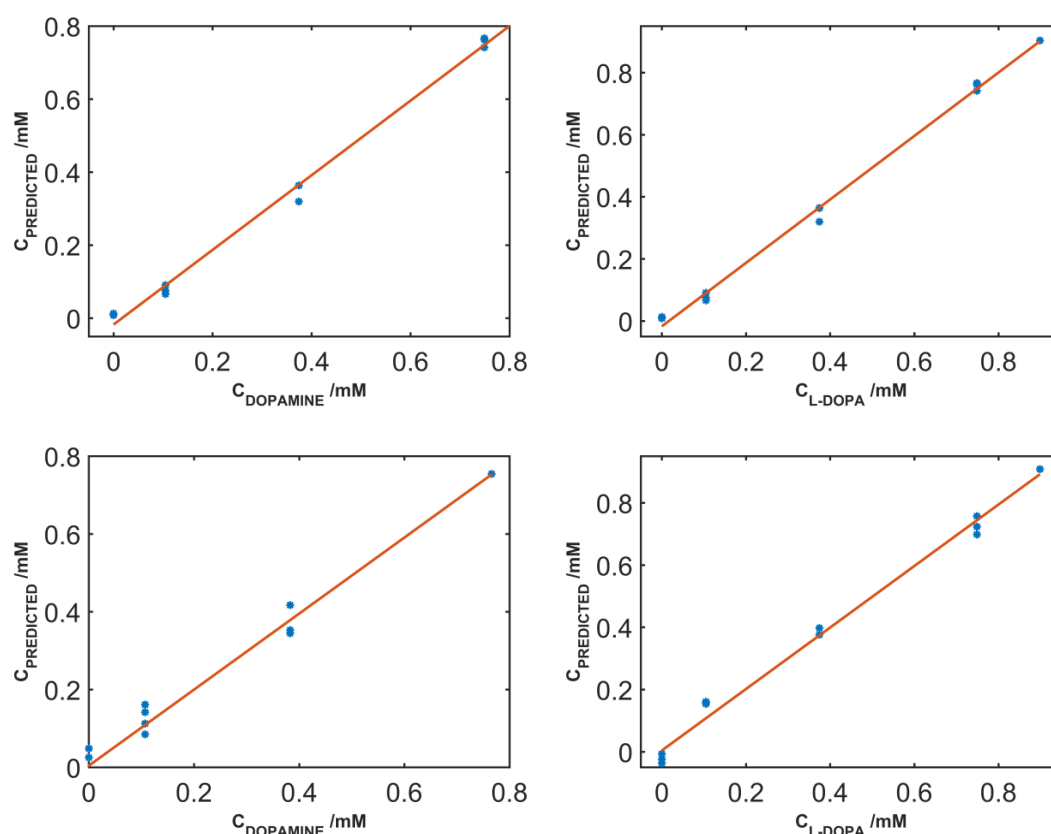


Figura 69. (a) Concentración predicha vs concentración rea para la L-dopa y la dopamina en el modelo electroquímico, (b) Concentración predicha vs concentración rea para la L-dopa y la dopamina en el modelo espectroscópico,. Concentración de las mezclas en Tabla 16.

3. Resultados y discusión

Como se puede comprobar, en ambos modelos la mejor regresión se obtiene para la L-dopa, con un coeficiente de determinación de 0.996 para el modelo electroquímico y 0.988 para el modelo espectroscópico, siendo ligeramente peores los valores de la regresión para la dopamina, con coeficientes de determinación de 0.985 y 0.978 para el modelo electroquímico y el espectroscópico. A pesar de la alta complejidad de la muestra, tanto la señal electroquímica como la señal espectroscópica son capaces de resolver la mezcla obteniendo una buena discriminación de los componentes. Son muchos los trabajos encontrados en bibliografía en los que se fija la concentración de uno de los interferentes y se determina el otro. La potencialidad de la espectroelectroquímica queda demostrada al utilizar cantidades muy diferentes en cada uno de los patrones de calibración, que además han sido seleccionadas de forma aleatoria, tal como pudiera suceder en una situación real, donde no se puede fijar la cantidad de interferente.

Con el fin de determinar la capacidad de predicción de estos dos modelos de calibración, se utilizaron para predecir la concentración de cada uno de los dos neurotransmisores en una disolución mezcla (MP en la Tabla 16) donde la concentración de dopamina se fijó en 3.8×10^{-4} M y la de L-dopa en 3.7×10^{-4} M. Las estimaciones realizadas para cada analito con cada uno de los modelos dieron resultados satisfactorios en ambos modelos. El modelo electroquímico dio una predicción de 3.5×10^{-4} M para la dopamina y de 3.5×10^{-4} M para la L-dopa, es decir, un error relativo del 7.9% y del 5.4 % respectivamente. El modelo espectroscópico predice con una mayor exactitud, 3.7×10^{-4} M y la de L-dopa en 3.8×10^{-4} M, es decir, errores relativos menores del 3% para ambos analitos. Se puede determinar que la capacidad de predicción es muy alta en ambos casos a pesar de la gran complejidad del problema planteado, donde el solapamiento de las señales electroquímicas y espectroscópicas es prácticamente del 100%. Por otro lado, los %RSD ($\alpha = 0.05$) de las predicciones fueron del 7.2 % para la dopamina y del 7.0 para la L-dopa en el modelo electroquímico. En el caso del modelo espectroscópico, los %RSD ($\alpha = 0.05$) de las predicciones fueron del 4.4 % para la dopamina y del 11.3 para la L-dopa.

Con los resultados presentados para el análisis de esta mezcla, tras construir sendos modelos con PLSR tanto para datos electroquímicos como espectroscópicos, se puede asegurar, dado el carácter dinámico de las medidas realizadas, que la espectroelectroquímica permite resolver una mezcla en la que la separación de los potenciales de pico de las dos sustancias estudiadas es de tan solo 0.07 V y la separación entre las diferentes bandas de absorción de los espectros oscila en los 10 nm.

3.4.2 MEZCLAS DE DOPAMINA Y CATECOL

Con el fin de demostrar la potencialidad de la técnica, en el caso abordado en este apartado se eligieron como analitos interferentes la dopamina y el catecol que no pudieron ser resueltos electroquímicamente ya que sus voltamperogramas presentan un mayor solapamiento que en el caso anterior. Es en estos casos, donde la espectroelectroquímica puede mostrar todo su potencial para el análisis cuantitativo.

Como ha quedado demostrado a lo largo de esta Tesis Doctoral, la espectroelectroquímica es una técnica multirrespuesta que proporciona gran cantidad de información en un solo experimento. Este elevado volumen de datos resulta realmente útil en el análisis no solo cualitativo, sino también cuantitativo de diferentes especies y mezclas complejas. Al igual que en el caso anterior (mezcla dopamina y L-dopa) se hizo uso de una herramienta de análisis estadístico para el estudio del sistema formado por ahora por dopamina y catecol. En esta ocasión, los datos espectroscópicos obtenidos durante una serie de experiencias espectroelectroquímicas se analizaron mediante PARAFAC que presenta una mayor potencialidad que PLS cuando el cubo de datos tienen carácter trilineal.

Habitualmente, mezclas de dopamina y catecol se han resuelto mediante técnicas de separación como cromatografía líquida o microfluídica [243–246], es decir, técnicas que quedan alejadas de la espectroelectroquímica. En un primer intento para resolver esta mezcla compleja se pensó en el uso de técnicas electroquímicas, en concreto voltamperometría.

3. Resultados y discusión

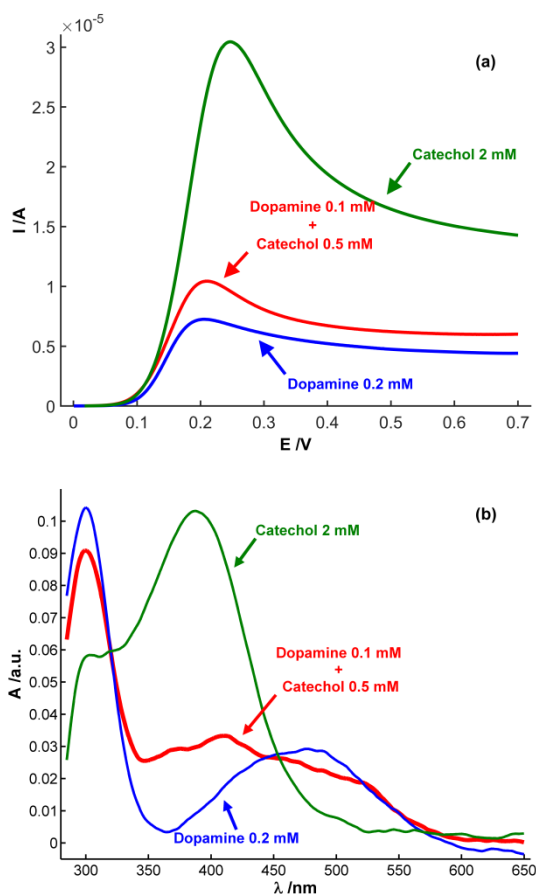


Figura 70. (a) Voltamperogramas lineales, y (b) espectros de absorción a +0.70 V.

$C_{\text{dopamina}} = 2.0 \times 10^{-4}$ M (línea azul), $C_{\text{catecol}} = 2.0 \times 10^{-3}$ M (línea verde), $C_{\text{dopamina}} = 1.0 \times 10^{-4}$ M y $C_{\text{catecol}} = 5.0 \times 10^{-4}$ M (línea roja). Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$

La Figura 70.a muestra los voltamperogramas obtenidos para cada una de las dos especies. Como se puede observar los picos de oxidación de dopamina y catecol presentan una diferencia en su posición inferior a 0.05 V, es decir, las técnicas electroquímicas clásicas hacen complicado la resolución de una mezcla de ambas especies. En cambio, los espectros de absorción de estas dos especies muestran características ligeramente diferentes que podrían permitir su resolución. Así, en la Figura 70.b, se puede ver que la dopamina presenta los ya comentados picos de absorción en 300 y 470 nm relacionados con la formación del dopaminocromo. Por su

parte, el catecol tiene un máximo de absorción situado en 388 nm que se superpone parcialmente con las dos bandas características de la dopamina, como así se puede ver en el espectro de absorción de una mezcla de estos dos compuestos.

La resolución de una mezcla de dopamina y catecol, se abordó en este caso utilizando únicamente los datos espectroscópicos recogidos de una serie de patrones de calibrado preparados en los que las concentraciones de ambos analitos se variaron de forma aleatoria. De nuevo, el problema es planteado en una situación de alta dificultad si se quiere resolver sin utilizar métodos de separación previos a la determinación. Dado el carácter trilineal de este set de datos (Figura 66), se utilizó PARAFAC como herramienta quimiométrica para tratar y analizar el conjunto de datos. Se preparó un conjunto de 10 muestras de calibrado en las que las concentraciones de dopamina se variaron entre 0 y 4.0×10^{-4} M y la de catecol entre 0 y 2.0×10^{-3} M (Tabla 17).

Tabla 17. Conjunto de muestras de calibrado para resolver la mezcla de dopamina y catecol.

MUESTRA	$C_{\text{CATECOL}} \times 10^{-3} \text{ (M)}$	$C_{\text{DOPAMINA}} \times 10^{-3} \text{ (M)}$
M1	0.0	0.1
M2	0.0	0.2
M3	1.0	0.0
M4	1.0	0.2
M5	1.0	0.4
M6	2.0	0.0
M7 (outlier)	2.0	0.2
M8	0.5	0.1
M9	1.5	0.1
M10	0.0	0.2
MP	0.5	0.3

Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$

V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$.

Para construir el modelo de PARAFAC se seleccionaron dos factores, uno por cada uno de los analitos presentes en la muestra, y se asumió la no negatividad de

3. Resultados y discusión

concentraciones y espectros. Se construyó un cubo de datos con los valores de absorbancia a 10 concentraciones, para 132 longitudes de onda comprendidas entre 290 y 390 nm, y para 85 potenciales comprendidos entre +0.15 y +0.55 V (matriz de $10 \times 132 \times 85$).

La Figura 71 muestra la deconvolución de la matriz de datos en la que contribuyen ambos analitos, dopamina y catecol. La representación de los loadings frente a la longitud de onda (Figura 71.c) muestra como el modelo de PARAFAC construido ha permitido separar de forma adecuada la contribución de los dos compuestos. Así la variable latente que muestra un pico en 300 nm en la representación de los loadings está relacionada con la dopamina, mientras que la variable con una banda en 380-390 nm corresponde con el catecol. Como podemos ver, la diferencia espectral de los productos de la reacción electroquímica favorece la posible resolución de la muestra. Al ver la representación de estos loadings con el potencial se puede observar que la oxidación del catecol es algo más rápida que la dopamina y el aumento más pronunciado de intensidad se produce a potenciales ligeramente más bajos que la dopamina (Figura 71.b), hecho que ayuda a resolver esta mezcla con los datos registrados durante experiencias espectroelectroquímicas.

Por último, la Figura 71.a presenta los scores de cada una de las dos variables latentes representadas frente a la concentración del analito con la que están relacionados. Así, se puede ver, como ya se había predicho de la representación de los loadings frente a la longitud de onda (Figura 71.c), que cada una de las variables latentes es proporcional a la concentración de cada uno de los dos compuestos.

En la Figura 71.a se puede ver como hay un punto anómalo que queda fuera de la relación lineal existente entre estos dos parámetros, scores-concentración (triángulo verde en la Figura 71.a). Este punto corresponde con una mezcla de dopamina-catecol donde la concentración de ambos compuestos es 2.0×10^{-4} M y 2.0×10^{-3} M, respectivamente.

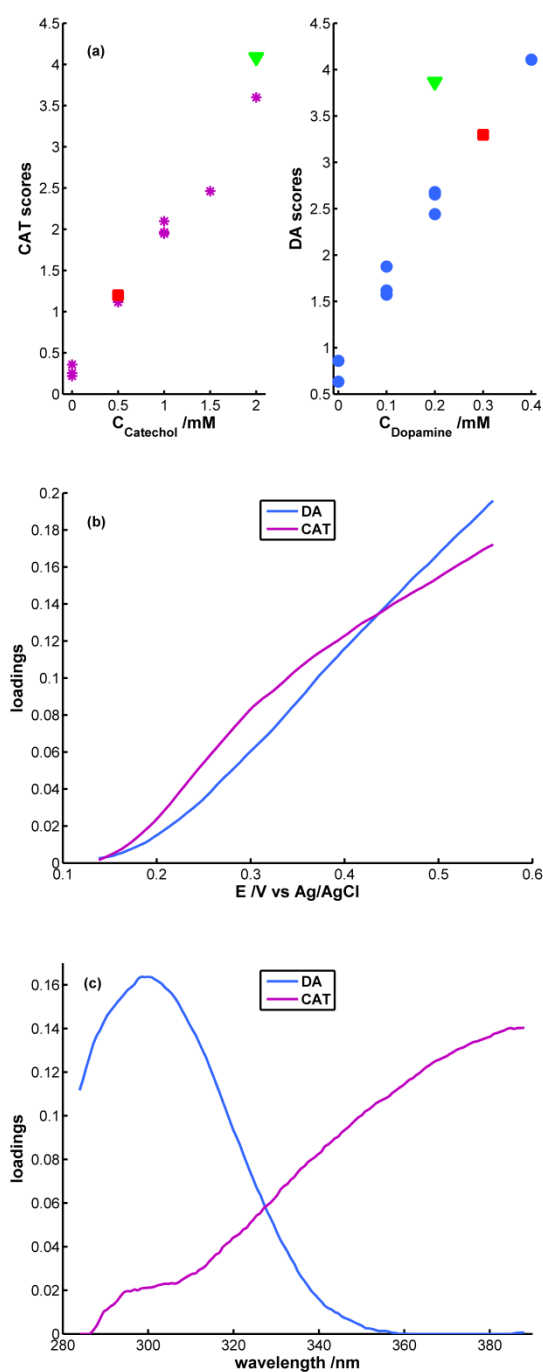


Figura 71. Deconvolución de la matriz de datos. (a) Scores vs concentración, (b) loadings vs potencial y (c) loadings vs longitud de onda para la mezcla de dopamina y catecol. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{\text{inicial}} = 0.00$ V, $E_{\text{final}} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = $0.01 \text{ V} \times \text{s}^{-1}$. Concentración de las mezclas en Tabla 17.

3. Resultados y discusión

Comparando la respuesta electroquímica y espectroscópica de este punto anómalo, con otra muestra que mantiene la linealidad esperada de los scores y que tenía la misma relación de concentraciones, se puede ver que hay diferencias que solo se pueden detectar con técnicas espectroelectroquímicas. En la Figura 72.a se representan comparados los voltamperogramas de la muestra cuya respuesta es anómala y la de la réplica que su respuesta era la esperada. Se puede comprobar como electroquímicamente no se detectan diferencias significativas entre ambas señales, es decir, únicamente la respuesta voltamperométrica no se podría utilizar para explicar la razón de ese punto anómalo. En cambio, analizando la evolución de los espectros se puede ver como en el caso del punto anómalo aparece una banda entre 550 y 600 nm no presente en el resto de las muestras del conjunto de calibración. En la Figura 72.b se presenta el voltabsorciograma a 600 nm para ambas muestras, y se puede ver claramente como la muestra con un comportamiento anómalo, presenta un aumento de absorbancia al aumentar el potencial aplicado. Este aumento da lugar a unos valores de absorbancia diferentes a los que le corresponderían para una disolución mezcla de dopamina y catecol con las concentraciones indicadas. La disolución utilizada en ambas medidas es la misma y las condiciones de trabajo también. Este diferente comportamiento a 600 nm ha sido observado en todos los estudios de dopamina-catecol que hemos realizado, dando lugar siempre que ha sido observada a un punto anómalo, lo que demuestra la utilidad de la espectroelectroquímica en la detección de *outliers*. Aunque no se ha encontrado explicación al comportamiento anómalo de esta medida, lo que sí ha permitido la realización de los experimentos espectroelectroquímicos es identificar este punto anómalo y determinar la razón por la que desde el punto de vista de las señales no es válido para la resolución de esta mezcla de compuestos. Como ya se ha indicado anteriormente, utilizando únicamente datos electroquímicos esta explicación no se habría podido encontrar debido a que ambos voltamperogramas son prácticamente idénticos.

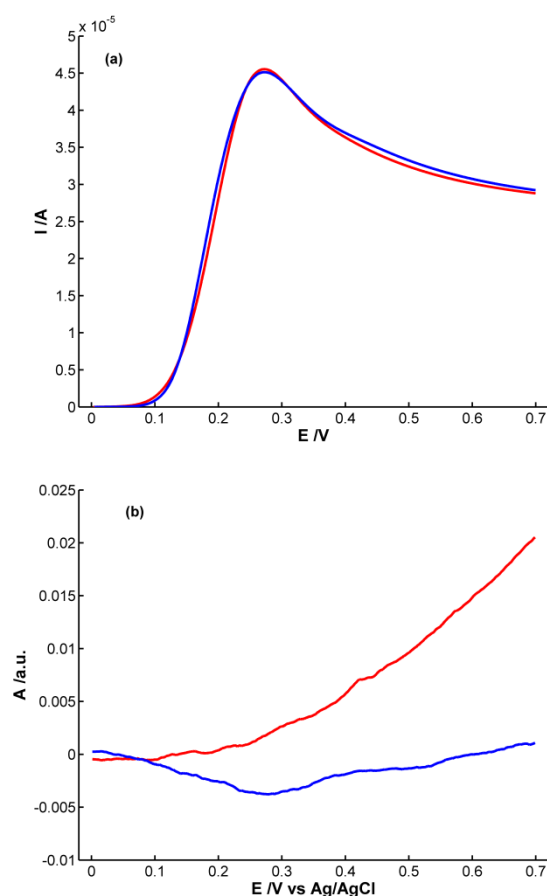


Figura 72. (a) Voltamperogramas y (b) voltabsorciogramas a 600 nm de dos réplicas de una mezcla de dopamina y catecol en tampón PBS. Disoluciones preparadas en tampón PBS (pH = 7). $E_{inicial} = 0.00$ V, $E_{final} = +0.70$ V, velocidad de barrido (v) = 0.01 V \times s $^{-1}$. $C_{catecol} = 2 \times 10^{-3}$ M, $C_{dopamina} = 2 \times 10^{-4}$ M.

Finalmente, la relación lineal encontrada entre los scores de cada una de las variables latentes y las concentraciones de dopamina o catecol ha permitido predecir la concentración de estos dos compuestos en una disolución problema donde las concentraciones eran de 3×10^{-4} M de dopamina y 5×10^{-3} M de catecol. El valor estimado de dopamina ha sido de 2.88×10^{-4} M, que comparado con el valor teórico indica un error relativo del 4%, mientras que para el catecol el valor estimado ha sido de 5.5×10^{-3} M, con un error relativo del 10%.

Nuevamente, queda demostrado el gran potencial que la espectroelectroquímica de absorción en el UV/Vis tiene en el análisis cuantitativo, y en especial en la

3. Resultados y discusión

resolución de mezclas altamente complejas donde el grado de solapamiento entre las señales medidas es muy elevado. Habitualmente estas mezclas complejas tienen que ser analizadas con ayuda de un método de separación previo. La capacidad de predicción del modelo de PARAFAC construido ha quedado demostrada y, un aspecto muy destacable, es la posibilidad que ofrece la espectroelectroquímica para explicar el comportamiento anómalo de algunas muestras o experiencias que no pueden ser razonadas con únicamente la señal electroquímica.

4. CONCLUSIONES

4. Conclusiones

1. Se ha diseñado y construido una nueva celda espectroelectroquímica para realizar medidas de reflexión interna de incidencia casi-normal (NNIRS) con electrodos serigrafiados comerciales en la región UV-Visible del espectro.
2. La celda espectroelectroquímica ha sido validada con diferentes sistemas químicos de referencia demostrando que puede ser utilizada con electrodos serigrafiados de diferente naturaleza y ofreciendo resultados óptimos.
3. Los mecanismos de oxidación de tres de los más importantes neurotransmisores: dopamina, adrenalina y L-dopa han sido confirmados, respecto a los propuestos en bibliografía, utilizando datos espectroelectroquímicos.
4. Se ha podido realizar la determinación individual de dopamina, adrenalina y L-dopa mediante espectroelectroquímica. Los rangos de concentración utilizados han sido del orden de 10^{-3}M a 10^{-5}M , por lo que queda demostrada la buena sensibilidad de la técnica en esta cuantificación individual.
5. A lo largo de este trabajo se han mostrado las diferentes posibilidades de análisis cuantitativo que permite la espectroelectroquímica. Tanto las señales electroquímicas como las espectroscópicas pueden ser utilizadas con análisis univariante en los casos más sencillos y con análisis multivariantes si el sistema es complejo. Particularmente interesante es el uso de PARAFAC con datos trilineales como son los espectroelectroquímicos.
6. Una de las principales ventajas de la espectroelectroquímica, por su propia naturaleza, es la autovalidación de los resultados. La obtención de dos modelos independientes y complementarios nos permite reasegurar la predicción de la muestra problema.
7. La detección de puntos anómalos también es más sencilla utilizando respuestas espectroelectroquímicas, no solo porque el punto suele ser un *outlier* en las dos técnicas, sino porque además la espectroscopía permite “ver” comportamientos que son difícilmente explicables a partir de la señal eléctrica.
8. Cuando los espectros de los analitos que proporcionan la respuesta óptica son diferentes es relativamente fácil resolver mezclas complejas, incluso cuando estos

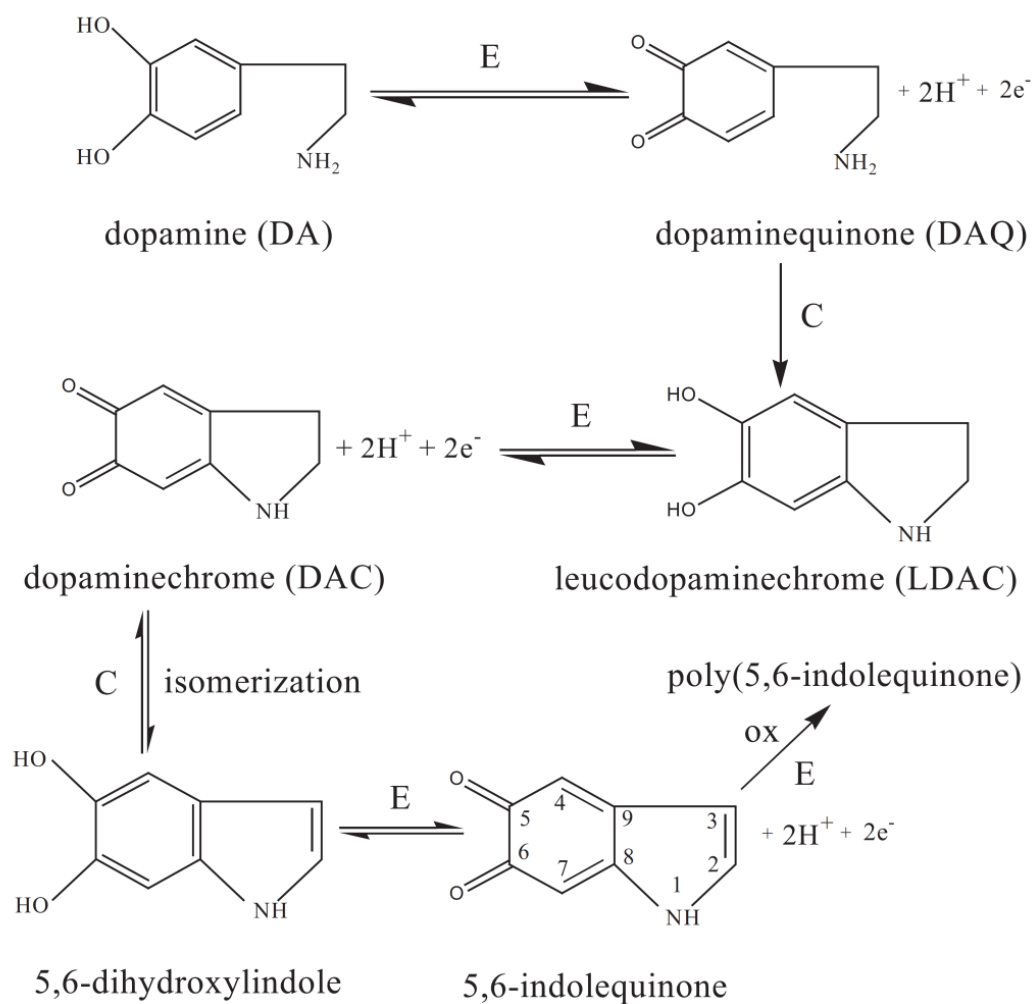
4. Conclusiones

compuestos se oxidan prácticamente al mismo potencial. Si los espectros son muy parecidos, basta con que exista una leve diferencia en los potenciales de oxidación/reducción para poder resolver la mezcla.

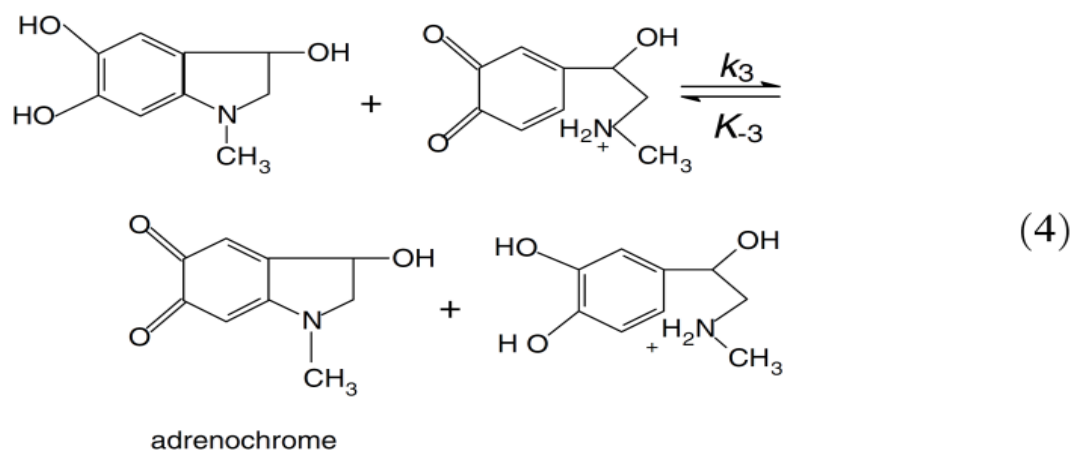
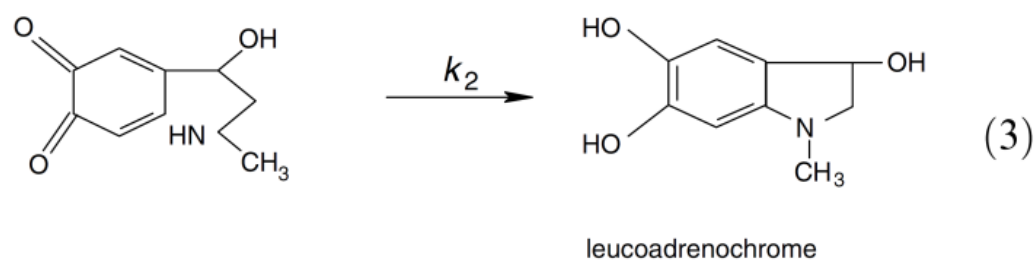
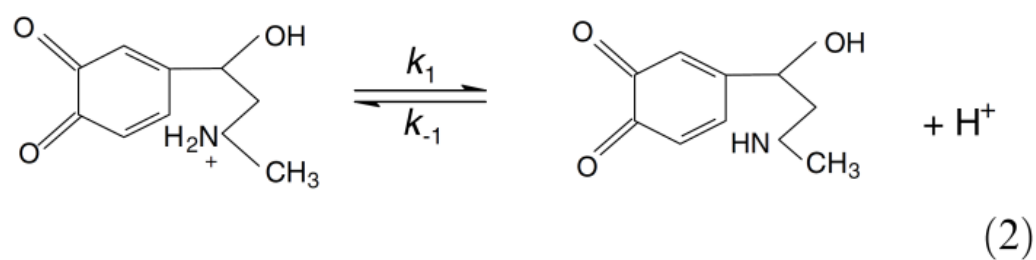
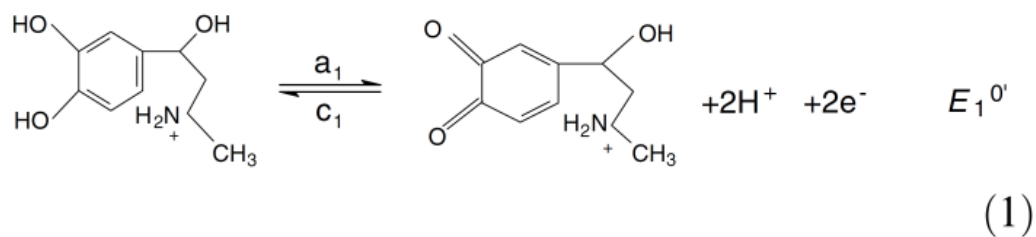
5. ANEXOS

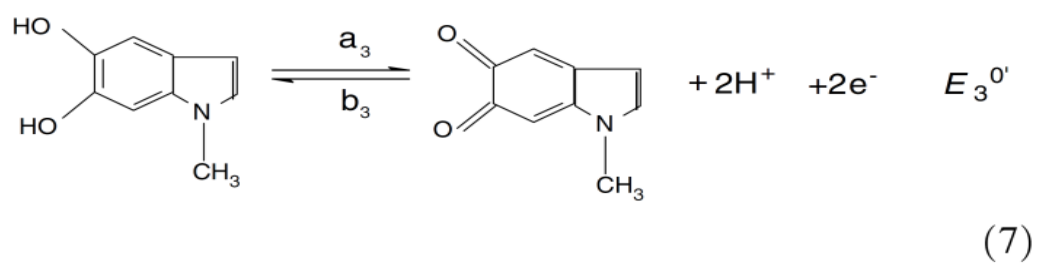
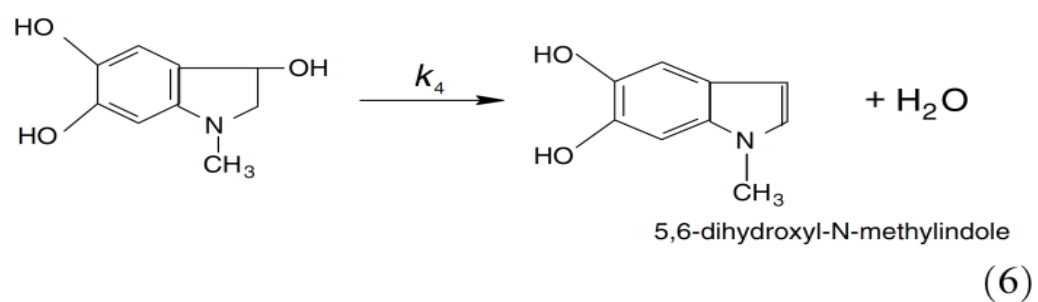
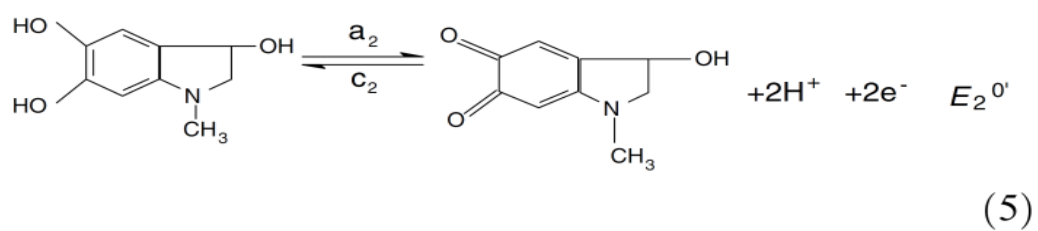
ANEXO 1. Mecanismos de oxidación

DOPAMINA

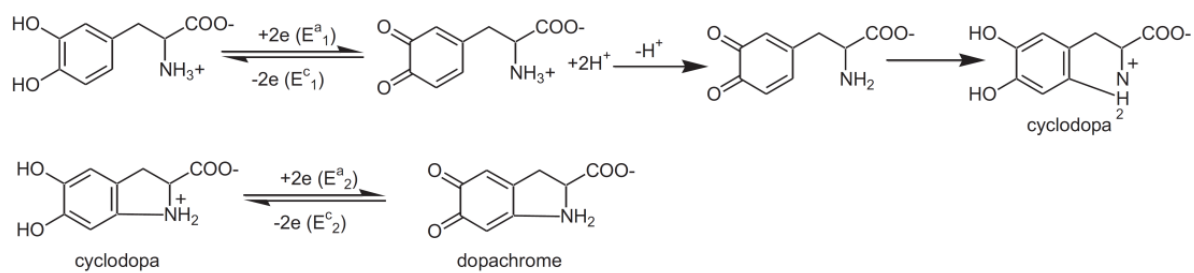


ADRENALINA



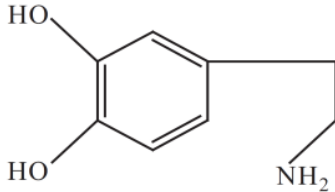
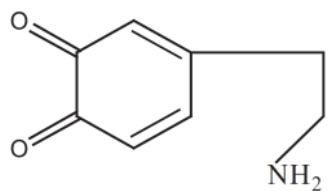
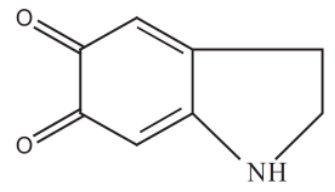
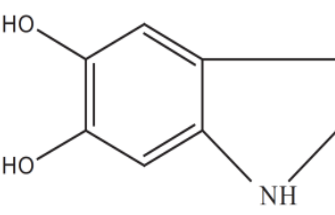
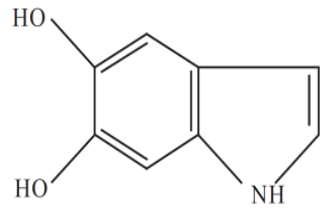


L-DOPA

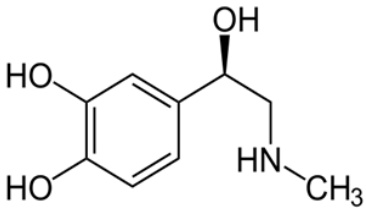
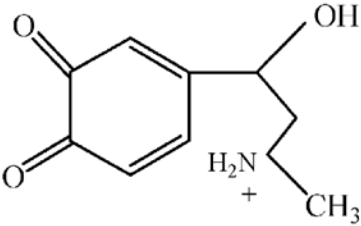
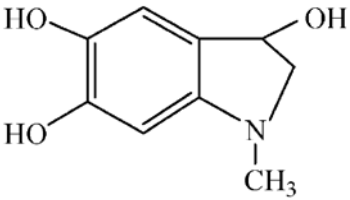
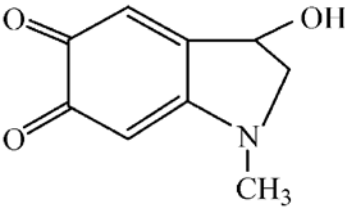
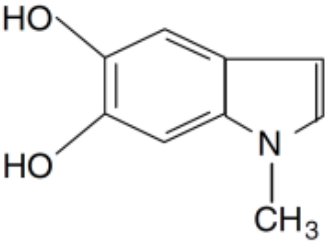


ANEXO 2. Productos de oxidación

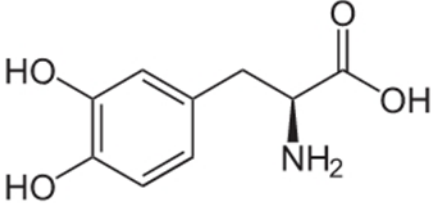
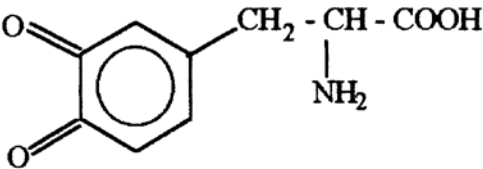
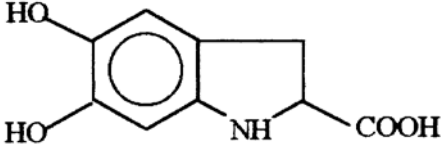
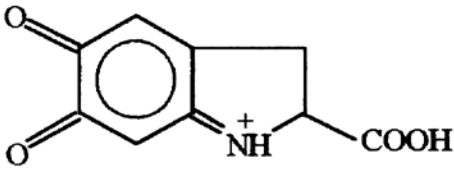
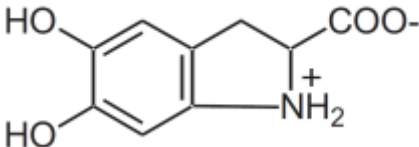
DOPAMINA

PRINCIPALES PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE DOPAMINA	FÓRMULA QUÍMICA
Dopamina	
Dopaminoquinona	
Dopaminocromo	
Leucodopaminocromo	
5,6- dihidroxindol	

ADRENALINA

PRINCIPALES PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE ADRENALINA	FÓRMULA QUÍMICA
Adrenalina	
Adenoquinona	
Leucoadenocromo	
Adenocromo	
5,6-dihidroxi-N-metilindol	

L-DOPA

PRINCIPALES PRODUCTOS DE OXIDACIÓN DE L-DOPA	FÓRMULA QUÍMICA
L-dopa	
Dopaquinona	
Leucodopacromo	
Dopacromo	
Ciclodopa	

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Kuwana, T.; Darlington, R. K.; Leedy, D. W. Electrochemical Studies Using Conducting Glass Indicator Electrodes. *Anal. Chem.* **1964**, 36, 2023–2025.
2. Karon, K.; Lapkowski, M.; Juozas, G. Electrochemical and UV-Vis/ESR spectroelectrochemical properties of polymers obtained from isomeric 2,7- and 3,6- linked carbazole trimers; influence of the linking topology on polymers properties. *Electrochim. Acta* **2014**, 123, 176–182.
3. Klod, S.; Haubner, K.; Jähne, E.; Dunsch, L. Charge stabilisation by dimer formation of an endcapped thiophene tetramer-an in situ NMR spectroelectrochemical study. *Chem. Sci.* **2010**, 1, 743–750.
4. Rapta, P.; Haubner, K.; Machata, P.; Lukes, V.; Rosenkranz, M.; Schiemenz, S.; Klod, S.; Kivela, H.; Kvarnstrom, C.; Hartmann, H.; Dunsch, L. Charged states in diphenylamino endcapped thiophenes with a 1,4-phenylene core: In situ electron spin resonance/ultraviolet–visible–near infrared and nuclear magnetic resonance spectroelectrochemistry and quantum chemical study. *Electrochim. Acta* **2013**, 110, 670–680.
5. Ventosa, E.; Palacios, J. L.; Unwin, P. R. Nucleation and growth of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) thin films on highly oriented pyrolytic graphite (HOPG) electrodes. *Electrochem. commun.* **2008**, 10, 1752–1755.
6. Pigani, L.; Heras, A.; Colina, Á.; Seeber, R.; López-Palacios, J. Electropolymerisation of 3,4-ethylenedioxythiophene in aqueous solutions. *Electrochem. commun.* **2004**, 6, 1192–1198.
7. Ruiz, V.; Colina, Á.; Heras, A.; López-Palacios, J. Study of electrochemical stability of conducting polymers by bidimensional spectroelectrochemistry: p- and n-doping of poly(4,4'-bis(butylthio)-2,2'-bithiophene) films. *Polym. Degrad. Stab.* **2006**, 91, 3117–3123.

8. Arion, V. B.; Rapta, P.; Telser, J.; Shova, S. S.; Breza, M.; Luspai, K.; Kozisek, J. Syntheses, electronic structures, and EPR/UV-vis-NIR spectroelectrochemistry of nickel(II), copper(II), and zinc(II) complexes with a tetradentate ligand based on S-methylisothiosemicarbazide. *Inorg. Chem.* **2011**, *50*, 2918–2931.
9. Toma, H. E.; Araki, K. Spectroelectrochemical Characterization of Organic and Metal-Organic Compounds. *Curr. Org. Chem.* **2002**, *6*, 21–34.
10. Dorneanu, S.-A.; Muresan, L. M.; Horovitz, O.; Popescu, I. C. Electrochemical and spectroelectrochemical behavior of N-methyl-phenothiazinyl meso-substituted porphyrins and their complexes with Ni(II), Cu(II) and Pd(II). *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *698*, 17–24.
11. Barreto, W. J.; Ando, R. A.; Santos, P. S.; Silva, W. P. Preparation, UV-vis, IR, EPR and resonance Raman study of Fe, Ni, Co and Zn dioxolene complexes. *Spectrochim. Acta. Part A* **2007**, *68*, 612–618.
12. Cerda, J. F.; Guzman, C. X.; Zhang, H.; Amendola, E. J.; Castorino, J. D.; Millet, N.; Fritz, A. L.; Houchins, D. N.; Roeder, M. H. Spectroelectrochemical measurements of redox proteins by using a simple UV/visible cell. *Electrochem. commun.* **2013**, *33*, 76–79.
13. Anderson, M. R.; Taylor, C. D. Infrared Spectroelectrochemistry. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry (Volume 11)*; Meyers, R. A., Ed.; John Wiley & Sons, 2006; Vol. 11, pp. 9849–9877.
14. Melin, F.; Hellwig, P. Recent advances in the electrochemistry and spectroelectrochemistry of membrane proteins. *Biol. Chem.* **2013**, *394*, 593–609.
15. Gonzalez-Dieguez, N.; Colina, A.; Lopez-Palacios, J.; Heras, A. Spectroelectrochemistry at screen-printed electrodes: determination of dopamine. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 9146–9153.

16. Garoz-Ruiz, J.; Izquierdo, D.; Colina, A.; Palmero, S.; Heras, A. Optical fiber spectroelectrochemical device for detection of catechol at press-transferred single-walled carbon nanotubes electrodes. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3593–3602.
17. Chen, W.; Liu, X.-Y.; Qian, C.; Song, X.-N.; Li, W.-W.; Yu, H.-Q. An UV-vis spectroelectrochemical approach for rapid detection of phenazines and exploration of their redox characteristics. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *64*, 25–29.
18. Ma, J.; Habrioux, A.; Morais, C.; Lewera, A.; Vogel, W.; Verde-Gomez, Y.; Ramos-Sanchez, G.; Balbuena, P. B.; Alonso-Vante, N. Spectroelectrochemical Probing of the Strong Interaction between Platinum Nanoparticles and Graphitic Domains of Carbon. *ACS Catal.* **2013**, *3*, 1940–1950.
19. Smaranda, I.; Baibarac, M.; Baltog, I.; Mevellec, J. Y.; Lefrant, S. Spectroelectrochemical properties of the single walled carbon nanotubes functionalized with polydiphenylamine doped with heteropolyanions. *J. Solid State Chem.* **2013**, *197*, 352–360.
20. Heras, A.; Colina, A.; López-Palacios, J.; Kaskela, A.; Nasibulin, A. G.; Ruiz, V.; Kauppinen, E. I. Flexible optically transparent single-walled carbon nanotube electrodes for UV–Vis absorption spectroelectrochemistry. *Electrochem. commun.* **2009**, *11*, 442–445.
21. Fernandez-Blanco, C.; Ibañez, D.; Colina, a.; Ruiz, V.; Heras, a. Spectroelectrochemical study of the electrosynthesis of Pt nanoparticles/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) composite. *Electrochim. Acta* **2014**, *145*, 139–147.
22. Fernández-Blanco, C.; Colina, A.; Heras, A.; Ruiz, V.; López-Palacios, J. Multipulse strategies for the electrosynthesis of gold nanoparticles studied by UV/Vis spectroelectrochemistry. *Electrochem. commun.* **2012**, *18*, 8–11.
23. Fernández-Blanco, C.; Colina, a.; Heras, a.; Ruiz, V.; López-Palacios, J. Multipulse strategies for the electrosynthesis of gold nanoparticles studied by UV/Vis spectroelectrochemistry. *Electrochem. commun.* **2012**, *18*, 8–11.

24. Fernandez-Blanco, C.; Heras, A.; Ruiz, V.; Colina, A. Spectroelectrochemical synthesis of gold nanoparticles using cyclic voltammetry in the presence of a protective agent. *RSC Adv.* **2014**, *4*, 45168–45173.
25. Ibañez, D.; Fernandez-Blanco, C.; Heras, A.; Colina, A. Time-Resolved Study of the Surface-Enhanced Raman Scattering Effect of Silver Nanoparticles Generated in Voltammetry Experiments. *J. Phys. Chem. C* **2014**, *118*, 23426–23433.
26. Izquierdo, D.; Martinez, A.; Heras, A.; Lopez-Palacios, J.; Ruiz, V.; Dryfe, R. A. W.; Colina, A. Spatial scanning spectroelectrochemistry. Study of the electrodeposition of Pd nanoparticles at the liquid/liquid interface. *Anal. Chem.* **2012**, *84*, 5723–5730.
27. Fernández-Blanco, C.; Colina, A.; Heras, A. UV/Vis spectroelectrochemistry as a tool for monitoring the fabrication of sensors based on silver nanoparticle modified electrodes. *Sensors (Basel)*. **2013**, *13*, 5700–11.
28. Tesarova, E.; Heras, A.; Colina, A.; Ruiz, V.; Svancara, I.; Vytras, K.; López-Palacios, J. A spectroelectrochemical approach to the electrodeposition of bismuth film electrodes and their use in stripping analysis. *Anal. Chim. Acta* **2008**, *608*, 140–146.
29. Liu, X.; Zhang, Z.; Cheng, G.; Dong, S. Spectroelectrochemical and Voltammetric Studies of L-DOPA. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 103–107.
30. Shtoyko, T.; Maghasi, A. T.; Richardson, J. N.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical Sensing Based on Attenuated Total Internal Reflectance Stripping Voltammetry. 1. Determination of Lead and Cadmium. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 4585–4590.
31. Richardson, J. N.; Dyer, A. L.; Stegemiller, M. L.; Zudans, I.; Seliskar, C. J.; Heineman, W. R. Spectroelectrochemical sensing based on multimode selectivity simultaneously achievable in a single device. 13. Detection of aqueous iron by in situ complexation with 2,2'-bipyridine. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 3330–3335.

32. Ashley, K.; Pons, S. Infrared spectroelectrochemistry. *Chem. Rev.* **1988**, *88*, 673–695.
33. Ashley, K. Solution Infrared Spectroelectrochemistry: A review. *Talanta* **1991**, *38*, 1209–1218.
34. Barreto, W. J.; Barreto, S. R.; Ando, R. A.; Santos, P. S.; DiMauro, E.; Jorge, T. Raman, IR, UV-vis and EPR characterization of two copper dioxolene complexes derived from L-dopa and dopamine. *Spectrochim. Acta. Part A* **2008**, *71*, 1419–1424.
35. Rapta, P.; Bartl, A.; Gromov, A.; Stasko, A.; Dunsch, L. In situ ESR/Vis/NIR spectroelectrochemistry of [60]fullerene: the origin of ESR “spikes” and the reactivity of pristine fullerene anions. *Chemphyschem* **2002**, *3*, 351–356.
36. Araujo, C. S.; Drew, M. G. B.; Felix, V.; Jack, L.; Madureira, J.; Newell, M.; Roche, S.; Santos, T. M.; Thomas, J. a; Yellowlees, L. Ru(II) electron transfer systems containing S-donor ligands. *Inorg. Chem.* **2002**, *41*, 2250–2259.
37. Klod, S.; Haubner, K.; Jähne, E.; Dunsch, L. Charge stabilisation by dimer formation of an endcapped thiophene tetramer—an in situ NMR spectroelectrochemical study. *Chem. Sci.* **2010**, *1*, 743–750.
38. Prenzler, P. D.; Bramley, R.; Downing, S. R.; Heath, G. A. High-field NMR spectroelectrochemistry of spinning solutions: simultaneous in situ detection of electrogenerated species in a standard probe under potentiostatic control. *Electrochem. commun.* **2000**, *2*, 516–521.
39. Klod, S.; Ziegs, F.; Dunsch, L. In situ NMR spectroelectrochemistry of higher sensitivity by large scale electrodes. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 10262–10267.
40. Boisseau, R.; Bussy, U.; Giraudeau, P.; Boujtita, M. In Situ Ultrafast 2D NMR Spectroelectrochemistry for Real-Time Monitoring of Redox Reactions. *Anal. Chem.* **2015**, *87*, 372–375.

41. Nunes, L. M. S.; Moraes, T. B.; Barbosa, L. L.; Mazo, L. H.; Colnago, L. A. Monitoring electrochemical reactions in situ using steady-state free precession (13)C NMR spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2014**, *850*, 1–5.
42. Le Ru, E. C.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Proof of single-molecule sensitivity in surface enhanced Raman scattering (SERS) by means of a two-analyte technique. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 1944–1948.
43. Nie, S.; Emory, S. R. Probing Single Molecules and Single Nanoparticles by Surface-Enhanced Raman Scattering. *Science* (80-.). **1997**, *275*, 1102–1106.
44. Le Ru, E. C.; Blackie, E.; Meyer, M.; Etchegoin, P. G. Surface Enhanced Raman Scattering Enhancement Factors: A Comprehensive Study. *J. Phys. Chem. C* **2007**, *111*, 13794–13803.
45. Blackie, E. J.; Le Ru, E. C.; Etchegoin, P. G. Single-molecule surface-enhanced Raman spectroscopy of nonresonant molecules. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 14466–14472.
46. Kalbác, M.; Kavan, L.; Dunsch, L. In situ Raman spectroelectrochemistry as a tool for the differentiation of inner tubes of double-wall carbon nanotubes and thin single-wall carbon nanotubes. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 9074–9081.
47. Jeanmaire, D. L.; Suchanski, M. R.; Duyne, R. P. Van Resonance Raman Spectroelectrochemistry. I. The Tetracyanoethylene Anion Radical. *J. Am. Chem. Soc.* **1975**, *97*, 1699–1707.
48. Zanfognini, B.; Colina, a.; Heras, a.; Zanardi, C.; Seeber, R.; López-Palacios, J. A UV–Visible/Raman spectroelectrochemical study of the stability of poly(3,4-ethylenedioxythiophene) films. *Polym. Degrad. Stab.* **2011**, *96*, 2112–2119.
49. Colina, A.; Ruiz, V.; Heras, A.; Ochoteco, E.; Kauppinen, E.; López-Palacios, J. Low resolution Raman spectroelectrochemistry of single walled carbon nanotube electrodes. *Electrochim. Acta* **2011**, *56*, 1294–1299.

50. Ibañez, D.; Romero, E. C.; Heras, a.; Colina, a. Dynamic Raman Spectroelectrochemistry of Single Walled Carbon Nanotubes modified electrodes using a Langmuir-Schaefer method. *Electrochim. Acta* **2014**, 129, 171–176.
51. Ibañez, D.; Romero, E. C.; Heras, A.; Colina, A. Dynamic Raman Spectroelectrochemistry of Single Walled Carbon Nanotubes modified electrodes using a Langmuir-Schaefer method. *Electrochim. Acta* **2014**, 129, 171–176.
52. Rapta, P.; Dunsch, L. Dimerisation of organic radical ions and redox reactions of dimers as studied by temperature-dependent in situ ESR/UV–vis–NIR spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, 507, 287–292.
53. Zalibera, M.; Rapta, P.; Popov, A. A.; Dunsch, L. Charged States of Four Isomers of C₈₄ Fullerene: In Situ ESR and Vis-NIR Spectroelectrochemistry and DFT Calculations. *J. Phys. Chem. C* **2009**, 113, 5141–5149.
54. Petr, A.; Dunsch, L.; Neudeck, A. In situ UV-vis ESR spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **1996**, 412, 153–158.
55. Gadgil, B.; Dmitrieva, E.; Damlin, P.; Ääritalo, T.; Kvarnström, C. Redox reactions in a linear polyviologen derivative studied by in situ ESR/UV-vis-NIR spectroelectrochemistry. *J. Solid State Electrochem.* **2014**, 19, 77–83.
56. Karon, K.; Lapkowski, M.; Dabulienė, A.; Tomkeviciene, A.; Kostiv, N.; Grazulevicius, J. V. Spectroelectrochemical characterization of conducting polymers from star-shaped carbazole-triphenylamine compounds. *Electrochim. Acta* **2015**, 154, 119–127.
57. Crayston, J. . Spectroelectrochemistry. In *Comprehensive Coordination Chemistry II (Volume 1)*; McCleverty, J. A.; Meyer, T. J., Eds.; Elsevier Science, 2003; pp. 775–789.
58. Wang, J. *Analytical Electrochemistry*; John Wiley & Sons, Ed.; 3rd ed.; New York, 2006.

59. *Electrochemical methods. Fundamentals and applications.*; Bard, A. J.; Faulkner, L. R., Eds.; 2nd ed.; John Wiley & sons: New York, 2001.
60. Berkes, B. B.; Vesztergom, S.; Inzelt, G. Combination of nanogravimetry and visible spectroscopy: A tool for the better understanding of electrochemical processes. *J. Electroanal. Chem.* **2014**, 719, 41–46.
61. Ruiz, V.; Colina, A.; Heras, A.; Lopez-Palacios, J. Quantized spectroelectrochemical behaviour of monolayer-protected gold cluster films assessed by reflectance spectroelectrochemical quartz crystal microbalance. *Electrochem. commun.* **2007**, 9, 255–261.
62. Venturi, M. Spectroelectrochemistry. In *The Exploration of Supramolecular Systems and Nanostructures by Photochemical Techniques*; Ceroni, P., Ed.; Springer: Dordrecht, 2012; Vol. 78.
63. Rafiee, M.; Nematollahi, D. Electrochemical study of catechol–boric acid complexes. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 2751–2756.
64. Kim, S. K.; Lee, J. W.; Yeo, I.-H. Spectroelectrochemical and electrochemical behavior of epinephrine at a gold electrode. *Electrochim. Acta* **2000**, 45, 2889–2895.
65. Salbeck, J. An electrochemical cell for simultaneous electrochemical and spectroelectrochemical measurements under semi-infinite diffusion conditions and thin-layer conditions. *J. Electroanal. Chem.* **1992**, 340, 169–195.
66. Conklin, S. D.; Heineman, W. R.; Seliskar, C. J. Spectroelectrochemical Sensing Based on Multimode Selectivity Simultaneously Achievable in a Single Device. 18. Preparation and Characterization of Cross-Linked Quaternized Poly(4-vinylpyridinium) Films. *Electroanalysis* **2005**, 17, 1433–1440.
67. López-Palacios, J.; Colina, A.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L. Bidimensional Spectroelectrochemistry. *Anal. Chem.* **2001**, 73, 2883–2889.

68. Ruiz, V.; Colina, Á.; Heras, A.; López-Palacios, J. Electropolymerization under potentiodynamic and potentiostatic conditions. Spectroelectrochemical study on electrosynthesis of poly[4,4'-bis(2-methylbutylthio)-2,2'-bithiophene]. *Electrochim. Acta* **2004**, *50*, 59–67.
69. Keyes, T. E.; Forster, R. J. Spectroelectrochemistry. In *Handbook of Electrochemistry*; Zoski, C. ., Ed.; Elsevier B.V.: Dublin, 2007; pp. 591–635.
70. López-Palacios, J.; Muñoz, E.; Heras, M. A.; Colina, Á.; Ruiz, V. Study of polyaniline films degradation by thin-layer bidimensional spectroelectrochemistry. *Electrochim. Acta* **2006**, *52*, 234–239.
71. Heras, A.; Colina, A.; Ruiz, V.; López-Palacios, J. UV-Visible Spectroelectrochemical Detection of Side-Reactions in the Hexacyanoferrate(III)/(II) Electrode Process. *Electroanalysis* **2003**, *15*, 702–708.
72. Schwarz, J.; Oelßner, W.; Kaden, H.; Schumer, F.; Hennig, H. Voltammetric and spectroelectrochemical studies on 4-aminophenol at gold electrodes in aqueous and organic media. *Electrochim. Acta* **2003**, *48*, 2479–2486.
73. Heineman, W. .; DeAngelis, T. .; Goelz, J. . Mercury Film Nickel Minigrid Optically Transparent Thin Layer Electrochemical Cell. *Anal. Chem.* **1975**, *47*, 1364–1369.
74. Krejčík, M.; Danek, M.; Hartl, F. Simple construction of an infrared optically transparent thin-layer electrochemical cell. *J. Electroanal. Chem.* **1991**, *317*, 179–187.
75. Heineman, W. .; Kuwana, T. Mercury Platinum Optically Transparent Electrode. *Anal. Chem.* **1971**, *43*, 1075–1078.
76. Garoz-Ruiz, J.; Palmero, S.; Ibañez, D.; Heras, a.; Colina, a. Press-transfer optically transparent electrodes fabricated from commercial single-walled carbon nanotubes. *Electrochem. commun.* **2012**, *25*, 1–4.

77. Pyun, C.-H.; Park, S.-M. Construction of a microcomputer controlled near normal incidence reflectance spectroelectrochemical system and its performance evaluation. *Anal. Chem.* **1986**, 58, 251–256.
78. Renedo, O. D.; Alonso-Lomillo, M. a.; Martínez, M. J. A. Recent developments in the field of screen-printed electrodes and their related applications. *Talanta* **2007**, 73, 202–219.
79. Laschi, S.; Mascini, M. Planar electrochemical sensors for biomedical applications. *Med. Eng. Phys.* **2006**, 28, 934–943.
80. González García, M. B.; Costa Garcia, A. Los biosensores electroquímicos: herramientas de la analítica y del diagnóstico clínico. *Monogr. XXX Biomarcadores Analítica, diagnóstico y Ter.* **2010**, 197–222.
81. Taleat, Z.; Khoshroo, A.; Mazloum-Ardakani, M. Screen-printed electrodes for biosensing: A review (2008-2013). *Microchim. Acta* **2014**, 181, 865–891.
82. Hayat, A.; Marty, J. L. Disposable screen printed electrochemical sensors: Tools for environmental monitoring. *Sensors* **2014**, 14, 10432–10453.
83. Banica, F.-G. *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons, 2012.
84. Eggings, B. . *Chemical Sensors and Biosensors*; John Wiley & Sons, 2002.
85. Liao, W.-C.; Ho, J.-A. A. Attomole DNA electrochemical sensor for the detection of Escherichia coli O157. *Anal. Chem.* **2009**, 81, 2470–2476.
86. Dey, R. S.; Raj, C. R. Development of an amperometric cholesterol biosensor based on graphene-Pt nanoparticle hybrid material. *J. Phys. Chem. C* **2010**, 114, 21427–21433.
87. Carrara, S.; Shumyantseva, V. V.; Archakov, A. I.; Samorì, B. Screen-printed electrodes based on carbon nanotubes and cytochrome P450scc for highly sensitive cholesterol biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2008**, 24, 148–150.

88. Liu, G.; Lin, Y. Y.; Wang, J.; Wu, H.; Wai, C. M.; Lin, Y. Disposable electrochemical immunosensor diagnosis device based on nanoparticle probe and immunochromatographic strip. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 7644–7653.
89. Wu, J.; Tang, J.; Dai, Z.; Yan, F.; Ju, H.; Murr, N. El A disposable electrochemical immunosensor for flow injection immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *22*, 102–108.
90. Ozkan, D.; Karadeniz, H.; Erdem, A.; Mascini, M.; Ozsoz, M. Electrochemical genosensor for Mitomycin C-DNA interaction based on guanine signal. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, *35*, 905–912.
91. Darain, F.; Park, S. U.; Shim, Y. B. Disposable amperometric immunosensor system for rabbit IgG using a conducting polymer modified screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 773–780.
92. Kalá, T.; Skládal, P. A disposable amperometric immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal. Chim. Acta* **1995**, *304*, 361–368.
93. Grennan, K.; Strachan, G.; Porter, A. J.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. Atrazine analysis using an amperometric immunosensor based on single-chain antibody fragments and regeneration-free multi-calibrant measurement. *Anal. Chim. Acta* **2003**, *500*, 287–298.
94. Jin, G.; Norrish, J.; Too, C.; Wallace, G. Polypyrrole filament sensors for gases and vapours. *Curr. Appl. Phys.* **2004**, *4*, 366–369.
95. Centi, S.; Tombelli, S.; Minunni, M.; Mascini, M. Aptamer-based detection of plasma proteins by an electrochemical assay coupled to magnetic beads. *Anal. Chem.* **2007**, *79*, 1466–1473.
96. Dungchai, W.; Chailapakul, O.; Henry, C. S. Electrochemical detection for paper-based microfluidics. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5821–5826.

97. Ricci, F.; Amine, a.; Palleschi, G.; Moscone, D. Prussian Blue based screen printed biosensors with improved characteristics of long-term lifetime and pH stability. *Biosens. Bioelectron.* **2002**, *18*, 165–174.
98. Dequaire, M.; Degrand, C.; Limoges, B. An electrochemical metalloimmunoassay based on a colloidal gold label. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 5521–5528.
99. Cabaniss, G. E.; Diamantis, A. A.; Murphy, W. R.; Linton, R. W.; Meyer, T. J. Electrocatalysis of proton-coupled electron-transfer reactions at glassy carbon electrodes. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 1845–1853.
100. Gheysari, Z.; Jelvani, S.; Abolhosseini, S.; Rouhollahi, a.; Vatani, V.; Rabbani, M. Laser reactivation of gold and glassy carbon electrodes. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, *5*, 242–253.
101. Alsmeyer, Y. W.; McCreery, R. L. Surface Enhanced Raman Examination of Carbon Electrodes: Effects of Laser Activation and Electrochemical Pretreatment and Examination. *Langmuir* **1991**, *7*, 2370–2375.
102. Ranganathan, S.; Kuo, T.; McCreery, R. L. Facile Preparation of Active Glassy Carbon Electrodes with Activated Carbon and Organic Solvents. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 3574–3580.
103. McCreery, R. L.; Cline, K. K.; McDermott, C. A.; McDermott, M. T. Control of reactivity at carbon electrode surfaces. *Colloids Surfaces A* **1994**, *93*, 211–219.
104. Beilby, A. L.; Sasaki, T. a; Stern, H. M. Electrochemical Pretreatment of Carbon Electrodes as a Function of Potential, pH, and Time. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 976–980.
105. Wang, J.; Hutchins, L. Activation of glassy carbon electrodes by alternating current electrochemical treatment. *Anal. Chim. Acta* **1985**, *167*, 325–334.
106. Wang, J.; Tuzhi, P.; Villa, V. Activation of carbon fiber microelectrodes by alternating current electrochemical treatment. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1987**, *234*, 119–131.

107. Mattusch, J.; Hallmeier, K. H.; Stulik, K.; Pacakova, V. Pretreatment of Glassy-Carbon Electrodes By Anodic Galvanostatic Pulses With a Large-Amplitude. *Electroanalysis* **1989**, *1*, 405–412.
108. Štulík, K. Activation of solid electrodes. *Electroanalysis* **1992**, *4*, 829–834.
109. Hu, I.; Karweik, D. H.; Kuwana, T. Cleaning of glassware Unless otherwise stated , all glassware was cleaned in chromic acid and then. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *188*, 59–72.
110. Wang, J.; Pedrero, M.; Sakslund, H.; Hammerichb, O.; Pingarron, J. Electrochemical activation of screen-printed carbon strips. *Analyst* **1996**, *121*, 345–350.
111. Grennan, K.; Killard, A. J.; Smyth, M. R. Physical characterizations of a screen-printed electrode for use in an amperometric biosensor system. *Electroanalysis* **2001**, *13*, 745–750.
112. Teng, Y. J.; Zuo, S. H.; Lan, M. B. Direct electron transfer of Horseradish peroxidase on porous structure of screen-printed electrode. *Biosens. Bioelectron.* **2009**, *24*, 1353–1357.
113. Venton, B. .; Wightman, R. . Psychoanalytical electrochemistry: dopamine and behavior. *Anal. Chem.* **2003**, *75*, 414A–421A.
114. Schultz, W. Behavioral dopamine signals. *Trends Neurosci.* **2007**, *30*, 203–210.
115. Wise, R. a Dopamine, learning and motivation. *Nat. Rev. Neurosci.* **2004**, *5*, 483–494.
116. Missale, C.; Nash, S. R. S.; Robinson, S. W.; Jaber, M.; Caron, M. G. Dopamine receptors: from structure to function. *Physiol. Rev.* **1998**, *78*, 189–225.
117. Barreto, W. .; Ponzoni, S.; Sassi, P. A Raman and UV-Vis study of catecholamines oxidized with Mn(III). *Spectrochim. Acta Part A* **1998**, *55*, 65–72.

118. López, T.; Bata-García, J. L.; Esquivel, D.; Ortiz-Islas, E.; Gonzalez, R.; Ascencio, J.; Quintana, P.; Oskam, G.; Álvarez-Cervera, F. J.; Heredia-López, F. J.; Góngora-Alfaro, J. L. Treatment of parkinson's disease: Nanostructured sol-gel silica-dopamine reservoirs for controlled drug release in the central nervous system. *Int. J. Nanomedicine* **2011**, *6*, 19–31.
119. Wang, Y.; Li, Y.; Tang, L.; Lu, J.; Li, J. Application of graphene-modified electrode for selective detection of dopamine. *Electrochem. commun.* **2009**, *11*, 889–892.
120. M. Moreno; Sanchez-Arribas, A.; Bermejo, E.; Chicharro, M.; Zaparadiel, A.; Rodríguez, M. C.; Jalit, Y.; Rivas, G. A. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid using carbon nanotube modified screen-printed electrodes. *Talanta* **2010**, *80*, 2149–2156.
121. Lakshmi, D.; Bossi, A.; Whitcombe, M. J.; Chianella, I.; Fowler, S. A.; Subrahmanyam, S.; Piletska, E. V; Piletsky, S. A. Electrochemical Sensor for Catechol and Dopamine Based on a Catalytic Molecularly Imprinted Polymer-Conducting Polymer Hybrid Recognition Element. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 3576–3584.
122. Yin, T.; Wei, W.; Zeng, J. Selective detection of dopamine in the presence of ascorbic acid by use of glassy-carbon electrodes modified with both polyaniline film and multi-walled carbon nanotubes with incorporated beta-cyclodextrin. *Anal. Bioanal. Chem.* **2006**, *386*, 2087–2094.
123. Pumera, M.; Ambrosi, A.; Bonanni, A.; Chng, E. L. K.; Poh, H. L. Graphene for electrochemical sensing and biosensing. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2010**, *29*, 954–965.
124. Ma, W.; Sun, D.-M. Simultaneous Determination of Epinephrine and Dopamine with Poly(L-arginine) Modified Electrode. *Chinese J. Anal. Chem.* **2007**, *35*, 66–70.

125. Wen, X.-L.; Jia, Y.-H.; Liu, Z.-L. Micellar effects on the electrochemistry of dopamine and its selective detection in the presence of ascorbic acid. *Talanta* **1999**, *50*, 1027–1033.
126. Madrakian, T.; Afkhami, A.; Khalafi, L.; Mohammadnejad, M. Spectrophotometric determination of catecholamines based on their oxidation reaction followed by coupling with 4-aminobenzoic acid. *J. Braz. Chem. Soc.* **2006**, *17*, 1259–1265.
127. Vieira, I. da C.; Fatibello-Filho, O. Spectrophotometric determination of methyldopa and dopamine in pharmaceutical formulations using a crude extract of sweet potato root (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) as enzymatic source. *Talanta* **1998**, *46*, 559–564.
128. Dennis W. Barnum Spectrophotometric determination of catechol, epinephrine, dopa, dopamine and other aromatic vic-diols. *Anal. Chim. Acta* **1977**, *89*, 157–166.
129. Nagaraja, P.; Vasantha, R. a.; Sunitha, K. R. A new sensitive and selective spectrophotometric method for the determination of catechol derivatives and its pharmaceutical preparations. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2001**, *25*, 417–424.
130. Shahrokhian, S.; Asadian, E. Electrochemical determination of L-dopa in the presence of ascorbic acid on the surface of the glassy carbon electrode modified by a bilayer of multi-walled carbon nanotube and poly-pyrrole doped with tiron. *J. Electroanal. Chem.* **2009**, *636*, 40–46.
131. Baldrich, E.; Gómez, R.; Gabriel, G.; Muñoz, F. X. Magnetic entrapment for fast, simple and reversible electrode modification with carbon nanotubes: application to dopamine detection. *Biosens. Bioelectron. Bioelectron.* **2011**, *26*, 1876–1882.
132. Maldonado, S.; Morin, S.; Stevenson, K. J. Electrochemical oxidation of catecholamines and catechols at carbon nanotube electrodes. *Analyst* **2006**, *131*, 262–267.

133. Umasankar, Y.; Chen, S. M. Multi-walled carbon nanotubes with poly(methylene blue) composite film for the enhancement and separation of electroanalytical responses of catecholamine and ascorbic acid. *Sensors Actuators, B Chem.* **2008**, *130*, 739–749.
134. Yogeswaran, U.; Thiagarajan, S.; Chen, S. Nanocomposite of functionalized multiwall carbon nanotubes with nafion, nano platinum, and nano gold biosensing film for simultaneous determination of ascorbic acid, epinephrine, and uric acid. *Anal. Biochem.* **2007**, *365*, 122–131.
135. Perry, M.; Li, Q.; Kennedy, R. T. Review of recent advances in analytical techniques for the determination of neurotransmitters. *Anal. Chim. Acta* **2009**, *653*, 1–22.
136. Wang, Y.; Chen, Z. A novel poly(taurine) modified glassy carbon electrode for the simultaneous determination of epinephrine and dopamine. *Colloids Surf. B. Biointerfaces* **2009**, *74*, 322–327.
137. Xue, K.-H.; Tao, F.-F.; Xu, W.; Yin, S.-Y.; Liu, J.-M. Selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid at the carbon atom wire modified electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2005**, *578*, 323–329.
138. Zhou, Y. Z.; Zhang, L. J.; Chen, S. L.; Dong, S. Y.; Zheng, X. H. Electroanalysis and simultaneous determination of dopamine and epinephrine at poly(isonicotinic acid)-modified carbon paste electrode in the presence of ascorbic acid. *Chinese Chem. Lett.* **2009**, *20*, 217–220.
139. Chen, Q.; Ai, S.; Ma, Q.; Yin, H. Selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid using ferrocenyl-tethered PAMAM dendrimers modified glassy carbon electrode. *J. Appl. Electrochem.* **2010**, *40*, 1379–1385.
140. Teixeira, M. F. S.; Bergamini, M. F.; Marques, C. M. P.; Bocchi, N. Voltammetric determination of L-dopa using an electrode modified with trinuclear ruthenium ammine complex (Ru-red) supported on Y-type zeolite. *Talanta* **2004**, *63*, 1083–1088.

141. Chicharro, M.; Sánchez, a.; Zapardiel, a.; Rubianes, M. D.; Rivas, G. Capillary electrophoresis of neurotransmitters with amperometric detection at melanin-type polymer-modified carbon electrodes. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 523, 185–191.
142. Powell, P. R.; Paxson, T. L.; Han, K. A.; Ewing, A. G. Analysis of biogenic amine variability among individual fly heads with micellar electrokinetic capillary chromatography-electrochemical detection. *Anal. Chem.* **2005**, 77, 6902–6908.
143. Xu, H.; Wang, D.; Zhang, W.; Zhu, W.; Yamamoto, K.; Jin, L. Determination of isatin and monoamine neurotransmitters in rat brain with liquid chromatography using palladium hexacyanoferrate modified electrode. *Anal. Chim. Acta* **2006**, 577, 207–213.
144. Zhang, W.; Wan, F.; Xie, Y.; Gu, J.; Wang, J.; Yamamoto, K.; Jin, L. Amperometric determination of (R)-salsolinol, (R)-N-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters with liquid chromatography using functionalized multi-wall carbon nanotube modified electrode in Parkinson's patients' cerebrospinal fluid. *Anal. Chim. Acta* **2004**, 512, 207–214.
145. Zhang, W.; Xie, Y.; Gu, J.; Ai, S.; Wang, J.; Yamamoto, K.; Jin, L. Liquid chromatography with amperometric detection at a nano crystalline Ce-doped lead dioxide film modified electrode for determination of (R)-Salsolinol, (R)-N-methylsalsolinol and monoamine neurotransmitters in Parkinsonian patients' cerebrospinal fluid. *Analyst* **2004**, 129, 229–234.
146. Lin, C. E.; Cheng, H. T.; Fang, I. J.; Liu, Y. C.; Kuo, C. M.; Lin, W. Y.; Lin, C. H. Strategies for enantioseparations of catecholamines and structurally related compounds by capillary zone electrophoresis using sulfated beta-cyclodextrins as chiral selectors. *Electrophoresis* **2006**, 27, 3443–3451.
147. Yoshitake, T.; Kehr, J.; Yoshitake, S.; Fujino, K.; Nohta, H.; Yamaguchi, M. Determination of serotonin, noradrenaline, dopamine and their metabolites in rat brain extracts and microdialysis samples by column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine and 1,2-diphenylethylenediamine. *J. Chromatogr. B* **2004**, 807, 177–183.

148. Li, W.; Rossi, D. T.; Fountain, S. T. Development and validation of a semi-automated method for L-dopa and dopamine in rat plasma using electrospray LC/MS/MS. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2000**, *24*, 325–333.
149. Hows, M. E. P.; Lacroix, L.; Heidbreder, C.; Organ, A. J.; Shah, A. J. High-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assay for the simultaneous measurement of dopamine, norepinephrine, 5-hydroxytryptamine and cocaine in biological samples. *J. Neurosci. Methods* **2004**, *138*, 123–132.
150. Ji, C.; Li, W.; Ren, X. D.; El-Kattan, A. F.; Kozak, R.; Fountain, S.; Lepsy, C. Diethylation labeling combined with UPLC/MS/MS for simultaneous determination of a panel of monoamine neurotransmitters in rat prefrontal cortex microdialysates. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 9195–9203.
151. Uutela, P.; Karhu, L.; Piepponen, P.; Kaenmaki, M.; Ketola, R. A.; Kostianen, R. Discovery of dopamine glucuronide in brain microdialysis samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal. Chem.* **2008**, *81*, 427–434.
152. Li, Y.; Liu, M.; Xiang, C.; Xie, Q.; Yao, S. Electrochemical quartz crystal microbalance study on growth and property of the polymer deposit at gold electrodes during oxidation of dopamine in aqueous solutions. *Thin Solid Films* **2006**, *497*, 270–278.
153. Zhang, F.; Dryhurst, G. Oxidation Chemistry of Dopamine: Possible Insights into the Age-Dependent Loss of Dopaminergic Nigrostriatal Neurons. *Bioorg. Chem.* **1993**, *21*, 392–410.
154. Lane, R. F.; Hubbard, A. T. Differential double pulse voltammetry at chemically modified platinum electrodes for in vivo determination of catecholamines. *Anal. Chem.* **1976**, *48*, 1287–1292.

155. Corona-Avendaño, S.; Alarcón-Angeles, G.; Ramírez-Silva, M. T.; Rosquete-Pina, G.; Romero-Romo, M.; Palomar-Pardavé, M. On the electrochemistry of dopamine in aqueous solution. Part I: The role of [SDS] on the voltammetric behavior of dopamine on a carbon paste electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2007**, *609*, 17–26.
156. Young, T. E.; Babbitt, B. W. Electrochemical study of the oxidation of α -methyldopamine, α -methylnoradrenaline, and dopamine. *J. Org. Chem.* **1983**, *48*, 562–566.
157. Manjunatha, J. G.; Swamy, B. E. K.; Mamatha, G. P.; Gilbert, O.; Chandrashekar, B. N.; Sherigara, B. S. Electrochemical Oxidation of Dopamine at Polyethylene glycol Modified Carbon Paste Electrode: A Cyclic Voltammetric Study. *Int. J. Electrochem. Sci.* **2010**, *5*, 1236–1245.
158. Kim, S.; Lee, J. W.; Yeo, I. H. Spectroelectrochemical and electrochemical behavior of epinephrine at a gold electrode. *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2889–2895.
159. Cui, H.; Wu, L.; Chen, J.; Lin, X. Multi-mode in situ spectroelectrochemical studies of redox pathways of adrenaline. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *504*, 195–200.
160. Flatmark, T. Catecholamine biosynthesis and physiological regulation in neuroendocrine cells. *Acta Physiol. Scand.* **2000**, *168*, 1–17.
161. Ni, F.; Wang, Y.; Zhang, D.; Gao, F.; Li, M. Electrochemical Oxidation of Epinephrine and Uric Acid at a Layered Double Hydroxide Film Modified Glassy Carbon Electrode and Its Application. *Electroanalysis* **2010**, *22*, 1130–1135.
162. Matos, R. C.; Angnes, L.; Araújo, M. C. U.; Saldanha, T. C. B. Modified microelectrodes and multivariate calibration for flow injection amperometric simultaneous determination of ascorbic acid, dopamine, epinephrine and dipyrone. *Analyst* **2000**, *125*, 2011–2015.

163. Wang, H.-S.; Huang, D.-Q.; Liu, R.-M. Study on the electrochemical behavior of epinephrine at a poly(3-methylthiophene)-modified glassy carbon electrode. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, 570, 83–90.
164. Harley-Mason, J. The chemistry of adrenochrome and its derivatives. *J. Chem. Soc.* **1950**, 1276–1282.
165. Hawley, M. D.; Tatawawadi, S. V.; Piekarski, S.; Adams, R. N. Electrochemical studies of the oxidation pathways of catecholamines. *J. Am. Chem. Soc.* **1967**, 89, 447–450.
166. Chen, S. M.; Peng, K. T. The electrochemical properties of dopamine, epinephrine, norepinephrine, and their electrocatalytic reactions on cobalt(II) hexacyanoferrate films. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 547, 179–189.
167. Andrews, A. C.; Lyons, T. D.; O'Brien, T. D. Copper(II), Cobalt(II), and Nickel(II) complexes of various antihistaminic compounds: their stability and thermodynamic values. *J. Chem. Soc.* **1961**, 1776–1780.
168. Hernández, P.; Sánchez, I.; Patón, F.; Hernández, L. Cyclic voltammetry determination of epinephrine with a carbon fiber ultramicroelectrode. *Talanta* **1998**, 46, 985–991.
169. Bishop, E.; Hussein, W. Anodic voltammetry of dopamine, noradrenaline and related compounds at rotating disc electrodes of platinum and gold. *Analyst* **1984**, 109, 627–632.
170. Bergamini, M. F.; Santos, A. L.; Stradiotto, N. R.; Zanoni, M. V. B. A disposable electrochemical sensor for the rapid determination of levodopa. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 39, 54–59.
171. Fang, J. Y.; Pérez, A.; Christine, C. W.; Leehey, M.; Aminoff, M. J.; Boyd, J. T.; Morgan, J. C.; Dhall, R.; Nicholas, A. P.; Bodis-Wollner, I.; Zweig, R. M.; Goudreau, J. L. Parkinson's disease severity and use of dopaminergic medications. *Parkinsonism Relat. Disord.* **2015**, 21, 297–299.

172. Gottwald, M. D.; Aminoff, M. J. Therapies for dopaminergic-induced dyskinesias in Parkinson disease. *Ann. Neurol.* **2011**, *69*, 919–927.
173. Nagaraja, P.; Vasantha, R. a; Sunitha, K. R. A sensitive and selective spectrophotometric estimation of catechol derivatives in pharmaceutical preparations. *Talanta* **2001**, *55*, 1039–46.
174. Afkhami, A.; Nematollahi, D.; Khatami, H. A. Kinetic-spectrophotometric determination of L-Dopa, Methyldopa, Dopamine and Adrenaline. *Asian J. Chem.* **2002**, *14*, 333–338.
175. Zhu, M.; Huang, X.; Li, J.; Shen, H. Peroxidase-based spectrophotometric methods for the determination of ascorbic acid, norepinephrine, epinephrine, dopamine and levodopa. *Anal. Chim. Acta* **1997**, *357*, 261–267.
176. Eisenhofer, G.; Goldstein, D. S.; Stull, R.; Kelser, H. R.; Sunderland, T.; Murphy, D. L.; Kopin, I. J. Simultaneous liquid-chromatographic determination of 3,4-dihydroxyphenylglycol, catecholamines, and 3,4-dihydroxyphenylalanine in plasma, and their responses to inhibition of monoamine oxidase. *Clin. Chem.* **1986**, *32*, 3030–3033.
177. Rangiah, K.; Palakodeti, D. Comprehensive analysis of neurotransmitters from regenerating planarian extract using an ultrahigh-performance liquid chromatography/mass spectrometry/selected reaction monitoring method. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 2439–2452.
178. Felice, L. J.; Felice, J. D.; Kissinger, P. T. Determination of catecholamines in rat brain parts by reverse-phase ion-pair liquid chromatography. *J. Neurochem.* **1978**, *31*, 1461–1465.
179. Robinson, G. M.; Smyth, M. R. Simultaneous Determination of Products and Intermediates of L -Dopa Oxidation Using Capillary Electrophoresis With Diode-array Detection. *Analyst* **1997**, *122*, 797–802.
180. Zhao, S.; Bai, W.; Wang, B.; He, M. Determination of levodopa by capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Talanta* **2007**, *73*, 142–146.

181. Hasegawa, T.; Takahashi, K.; Fukiwake, T.; Saijo, M.; Motoki, Y. Enantiomeric Determination of DOPA in Dietary Supplements Containing *Mucuna pruriens* by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *Food Hyg. Saf. Sci.* **2013**, *54*, 379–383.
182. Zapata-Urzúa, C.; Pérez-Ortiz, M.; Bravo, M.; Olivieri, a C.; Alvarez-Lueje, A. Simultaneous voltammetric determination of levodopa, carbidopa and benserazide in pharmaceuticals using multivariate calibration. *Talanta* **2010**, *82*, 962–968.
183. Babaei, A.; Sohrabi, M.; Taheri, A. R. Highly sensitive simultaneous determination of l-dopa and paracetamol using a glassy carbon electrode modified with a composite of nickel hydroxide nanoparticles/multi-walled carbon nanotubes. *J. Electroanal. Chem.* **2013**, *698*, 45–51.
184. Hu, G.; Chen, L.; Guo, Y.; Wang, X.; Shao, S. Selective determination of L-dopa in the presence of uric acid and ascorbic acid at a gold nanoparticle self-assembled carbon nanotube-modified pyrolytic graphite electrode. *Electrochim. Acta* **2010**, *55*, 4711–4716.
185. Robinson, G. M.; Iwuoha, E. I.; Smyth, M. R. Characterisation of electrosynthetic L-dopa-melanin films by electrochemical and spectroelectrochemical techniques. *Electrochim. Acta* **1998**, *43*, 3489–3496.
186. Raper, H. S. XIV. The tyrosinase-tyrosine reaction. *Biochem. J.* **1927**, *21*, 89–96.
187. Brun, A.; Rosset, R. Etude. electrochimique de l'oxydation de la dihydroxy-3,4 phenylalanine (dopa). Mecanisme d'oxydation des catechols en milieu acide. *Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1974**, *49*, 287–300.
188. Kagedal, B.; Konradsson, P.; Shibata, T.; Mishima, Y. High-performance liquid-chromatographic analysis of dopachrome and dihydroxyphenylalanine. *Anal. Biochem.* **1995**, *225*, 264–269.

189. Wang, Q.; Das, M. R.; Li, M.; Boukherroub, R.; Szunerits, S. Voltammetric detection of l-dopa and carbidopa on graphene modified glassy carbon interfaces. *Bioelectrochemistry* **2013**, 93, 15–22.
190. Nematollahi, D.; Alimoradi, M.; Rafiee, M. Kinetic study of electrochemically induced Michael reactions of o -benzoquinones with 2-acetylcyclohexanone and 2-acetylcyclopentanone. *J. Phys. Org. Chem.* **2007**, 20, 49–54.
191. Nematollahi, D.; Rafiee, M. Diversity in electrochemical oxidation of dihydroxybenzoic acids in the presence of acetylacetone. A green method for synthesis of new benzofuran derivatives. *Green Chem.* **2005**, 7, 638–644.
192. Capasso, R.; Evidente, A.; Schivo, L.; Orru, G.; Marcialis, M. A.; Cristinzio, G. Antibacterial-polyphenols-from-olive-oil-mill-waste-waters_1995_Journal-of-Applied-Bacteriology. *J. Appl. Bacteriol.* **1995**, 79, 393–398.
193. Van Den Heuvel, R. L.; Leppens, H.; Schoeters, G. E. Lead and catechol hematotoxicity in vitro using human and murine hematopoietic progenitor cells. *Cell Biol.Toxicol.* **1999**, 15, 101–110.
194. Hu, F.; Chen, S.; Wang, C.; Yuan, R.; Yuan, D.; Wang, C. Study on the application of reduced graphene oxide and multiwall carbon nanotubes hybrid materials for simultaneous determination of catechol, hydroquinone, p-cresol and nitrite. *Anal. Chim. Acta* **2012**, 724, 40–46.
195. Wang, C.; Yuan, R.; Chai, Y.; Hu, F. Simultaneous determination of hydroquinone, catechol, resorcinol and nitrite using gold nanoparticles loaded on poly-3-amino-5-mercapto-1,2,4-triazole-MWNTs film modified electrode. *Anal. Methods* **2012**, 4, 1626–1628.
196. Guo, Q.; Huang, J.; Chen, P.; Liu, Y.; Hou, H.; You, T. Simultaneous determination of catechol and hydroquinone using electrospun carbon nanofibers modified electrode. *Sensors Actuators B Chem.* **2012**, 163, 179–185.

197. Faure, E.; Falentin-Daudré, C.; Jérôme, C.; Lyskawa, J.; Fournier, D.; Woisel, P.; Detrembleur, C. Catechols as versatile platforms in polymer chemistry. *Prog. Polym. Sci.* **2013**, *38*, 236–270.
198. Zhang, Y.; Xiao, S.; Xie, J.; Yang, Z.; Pang, P.; Gao, Y. Simultaneous electrochemical determination of catechol and hydroquinone based on graphene–TiO₂ nanocomposite modified glassy carbon electrode. *Sensors Actuators B Chem.* **2014**, *204*, 102–108.
199. Quan, D.; Shin, W. Amperometric Detection of Catechol and Catecholamines by Immobilized Laccase from *DeniLite*. *Electroanalysis* **2004**, *16*, 1576–1582.
200. Schöning, M. J.; Jacobs, M.; Muck, a.; Knobbe, D.-T.; Wang, J.; Chatrathi, M.; Spillmann, S. Amperometric PDMS/glass capillary electrophoresis-based biosensor microchip for catechol and dopamine detection. *Sensors Actuators B Chem.* **2005**, *108*, 688–694.
201. Wallenborg, S. R.; Nyholm, L.; Lunte, C. E. End-column amperometric detection in capillary electrophoresis: influence of separation-related parameters on the observed half-wave potential for dopamine and catechol. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 544–549.
202. Chandra, S.; Lang, H.; Bahadur, D. Polyaniline-iron oxide nanohybrid film as multi-functional label-free electrochemical and biomagnetic sensor for catechol. *Anal. Chim. Acta* **2013**, *795*, 8–14.
203. Nematollahi, D.; Rafiee, M. Electrochemical oxidation of catechols in the presence of acetylacetone. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *566*, 31–37.
204. Ryan, M. D.; Yueh, A.; Wen-Yu, C. The Electrochemical Oxidation of Substituted Catechols. *J. Electrochem. Soc.* **1980**, *127*, 1489–1495.
205. Schweigert, N.; Zehnder, a. J. B.; Eggen, R. I. L. Chemical properties of catechols and their molecular modes of toxic action in cells, from microorganisms to mammals. *Environ. Microbiol.* **2001**, *3*, 81–91.

206. www.pineinst.com/echem/.
207. <https://www.gamry.com/products/spectroelectrochemistry/uv-vis-spectroelectrochemistry/>.
208. <http://www.bio-logic.info/potentiostat-electrochemistry-ec-lab/accessories/spectroelectrochemistry/>.
209. <http://www.zahner.de/products/photoelectrochemistry.html>.
210. <http://www.ecochemie.nl/Applications/>.
211. www.dropsens.com.
212. Lee, K. W.; Slinker, J. D.; Gorodetsky, a. a.; Flores-Torres, S.; Abruña, H. D.; Houston, P. L.; Malliaras, G. G. Photophysical properties of tris(bipyridyl)ruthenium(ii) thin films and devices. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2003**, 5, 2706–2709.
213. Innocenzi, P.; Kozuka, H.; Yoko, T. Fluorescence Properties of the Ru(bpy)₃ 2+ Complex Incorporated in Sol-Gel-Derived Silica Coating Films. *J. Phys. Chem. B* **1997**, 101, 2285–2291.
214. Shen, B.; Olbrich-Stock, M.; Posdorfer, J.; Schindler, R. N. An Optical and Spectroelectrochemical Investigation of Indigo Carmine. *Zeitschrift für Phys. Chemie* **1991**, 173, 251–255.
215. Díaz-González, M.; Fernández-Sánchez, C.; Costa-García, A. Comparative Voltammetric Behavior of Indigo Carmine at Screen-Printed Carbon Electrodes. *Electroanalysis* **2002**, 14, 665–670.
216. Fanjul-Bolado, P.; Hernández-Santos, D.; Lamas-Ardisana, P. J.; Martín-Pernía, A.; Costa-García, A. Electrochemical characterization of screen-printed and conventional carbon paste electrodes. *Electrochim. Acta* **2008**, 53, 3635–3642.

217. He, J. B.; Ma, G. H.; Chen, J. C.; Yao, Y.; Wang, Y. Voltammetry and spectroelectrochemistry of solid indigo dispersed in carbon paste. *Electrochim. Acta* **2010**, 55, 4845–4850.
218. Fernández-Sánchez, C.; Costa-García, a. Voltammetric studies of indigo adsorbed on pre-treated carbon paste electrodes. *Electrochem. commun.* **2000**, 2, 776–781.
219. Bond, A. M.; Marken, F.; Hill, E.; Compton, R. G.; Hügel, H. The electrochemical reduction of indigo dissolved in organic solvents and as a solid mechanically attached to a basal plane pyrolytic graphite electrode immersed in aqueous electrolyte solution. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 2* **1997**, 6, 1735–1742.
220. Strojek, J. W.; Kuwana, T. Electrochemical-spectroscopy using tin oxide-coated optically transparent electrodes. *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.* **1968**, 16, 471–483.
221. Petek, M.; Neal, T. E.; Murray, R. W. Spectroelectrochemistry-Application of Optically Transparent Minigrid Electrodes under Semi-Infinite Diffusion Conditions. *Anal. Chem.* **1971**, 43, 1069–1074.
222. Colina, A.; López-Palacios, J.; Heras, A.; Ruiz, V.; Fuente, L. Digital simulation model for bidimensional spectroelectrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, 553, 87–95.
223. Bancroft, E. E.; Sidwell, J. S.; Blount, H. N. Derivative linear sweep and derivative cyclic voltabsorptometry. *Anal. Chem.* **1981**, 53, 1390–1394.
224. Petek, M.; Neal, T. E.; Murray, R. W. Spectroelectrochemistry. Application of Optically Transparent Minigrid Electrodes under Semi-Infinite Diffusion Conditions. *Anal. Chem.* **1971**, 43, 1069–1074.
225. Kuwana, T.; Strojek, J. W. Kinetic and mechanism studies of o-tolidine electro-oxidation using optically transparent electrodes. *Discuss. Faraday Soc.* **1968**, 45, 134–144.

226. 1994-2015 The MathWorks Inc MATLAB - The Language of Technical Computing. *Dispon. en www.mathworks.com.*
227. 2014 The R Foundation for Statistical Computing The R Project for Statistical Computing. *Dispon. en <https://www.r-project.org/>.*
228. Colina, A. Tesis doctoral: “Procesos espectroelectroquímicos a potencial controlado. Desarrollo, validación y análisis de un modelo de simulación digital,” Universidad de Burgos, 2001.
229. Heras, A. Tesis doctoral: “Espectroelectroquímica Bidimensional,” Universidad de Burgos, 2002.
230. Ruiz, V. Tesis doctoral: “Espectroelectroquímica bidimensional aplicada a la electrosíntesis y caracterización de poli(4,4'-bis(alquiltio)-2,2'bitiofeno)s,” Universidad de Burgos, 2002.
231. Ventosa, E. Tesis doctoral: “Materiales híbridos nanoestructurados con base de poli(3,4-etilendioxitiofeno),” Universidad de Burgos, 2009.
232. Abdi, H. Partial Least Squares (PLS) Regression. In *Encyclopedia of Social Science Research Methods*; Lewis-Beck, M. S.; Bryman, A.; Liao, T. F., Eds.; SAGE Publications, Inc.: Thousand Oaks, CA, 2004; pp. 793–796.
233. Geladi, P.; Kowalski, B. R. Partial Least-Squares Regression: A tutorial. *Anal. Chim. Acta* **1986**, *185*, 1–17.
234. Vega-Vilca, J. C.; Guzmán, J. Regresión PLS y PCA como solución al problema de multicolinealidad en regresión múltiple. *Rev. Matemática Teoría y Apl.* **2011**, *18*, 9–20.
235. Langlois, D.; Chartier, S.; Gosselin, D. An Introduction to Independent Component Analysis : InfoMax and FastICA Algorithms. *Tutor. Quant. Methods Psychol.* **2010**, *6*, 31–38.
236. Hyvärinen, A. A.; Oja, E. E. Independent component analysis: algorithms and applications. *Neural Networks* **2000**, *13*, 411–430.

237. Comon, P. Independent component analysis, a new concept? *Signal Process.* **1994**, 36, 287–314.
238. Danzer, K.; Currie, L. A. GUIDELINES FOR CALIBRATION IN ANALYTICAL CHEMISTRY Guideline for calibration in analytical chemistry- Part 1 . Fundamentals and single component. *Pure Appl. Chem.* **1998**, 70, 993–1014.
239. Kim, S. H.; Yeo, I.-H. Spectroelectrochemical Studies on the Oxidation Pathway of Epinephrine. *Anal. Sci.* **1997**, 13, 321–324.
240. Skully, J. P.; McCreery, R. L. Glancing incidence external reflection spectroelectrochemistry with a continuum source. *Anal. Chem.* **1980**, 52, 1885–1889.
241. Murphy, B. P.; Schultz, T. M. Synthesis and Physical Properties of 5,6-Dihydroxyindole. *J. Org. Chem.* **1985**, 50, 2790–2791.
242. Beer, R. J. S.; Broadhurst, T.; Robertson, A. The Chemistry of the Melanins. Part V . 1947 The Chemistry. *J. Chem. Soc.* **1954**, 1947–1953.
243. Vilela, D.; Garoz, J.; Colina, Á.; González, M. C.; Escarpa, A. Carbon nanotubes press-transferred on PMMA substrates as exclusive transducers for electrochemical microfluidic sensing. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 10838–10844.
244. Kanamori, T.; Funatsu, T.; Tsunoda, M. Determination of catecholamines and related compounds in mouse urine using column-switching HPLC. *Analyst* **2016**, 141, 2568–2573.
245. Dossi, N.; Toniolo, R.; Susmel, S.; Pizzariello, A.; Bontempelli, G. A simple approach to the hydrodynamic injection in microchip electrophoresis with electrochemical detection. *Electrophoresis* **2010**, 31, 2541–2547.
246. Wang, Z.; Wang, W.; Chen, G.; Wang, W.; Fu, F. Liquid chromatography on a monolithic column microfluidic chip coupled with “three-T” sample injection mode and amperometric detection. *J. Sep. Sci.* **2010**, 33, 2568–2574.